#### **PCT**

## ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL Oficina Internacional



# SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes <sup>6</sup> : C12N 15/81, 9/88, 9/26

(11) Número de publicación internacional:

WO 98/14600

A1 (

(43) Fecha de publicación internacional:

9 de Abril de 1998 (09.04.98)

(21) Solicitud internacional:

PCT/CU97/00005

(22) Fecha de la presentación internacional:

3 de Octubre de 1997 (03.10.97)

(30) Datos relativos a la prioridad:

82/96

3 de Octubre de 1996 (03.10.96)

CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB) [CU/CU]; Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): RODRIGUEZ MENOCAL, Luis [CU/CU]; Apartamento 5B, Calle 186 No. 3115 entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU). CHAVEZ ESPINOZA, Francisco Pablo [CU/CU]; Calle 7ma No. 2305 entre 4ta y Aranguren, Cerro, Ciudad de la Habana 13400 (CU). GONZALEZ MARTINEZ, María Elena [CU/CU]; Calle 26 No. 1002, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana 12300 (CU). RIVERO BAEZA, Tanilo [CU/CU]; Calle 58B No. 6703 entre 47 y 49, Reparto Ceiba, Playa, Ciudad de la Habana 11300 (CU). BESABE TUERO, Liliana [CU/CU]; Apartamento

3C, Calle 186 No. 3115 entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU). PAIFER REYES, Edenia [CU/CU]; Apartamento 41, Calle 186 No. 3112 entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU). DELGADO BOADA, Julio Marcos [CU/CU]; Apartamento 52, Calle 184 No. 3112 entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU).

- (74) Mandatario: MORENO SAMPER, Olga Lidia; Lex, S.A., Avenida Ira. No. 1001, Esq. 10,, Miramar, Playa, Ciudad de la Habana 11300 (CU).
- (81) Estados designados: AU, BR, CA, CN, FI, JP, RU, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

#### Publicada

Con informe de búsqueda internacional.

Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.

Con una indicación relativa a un microorganismo depositado, presentada de conformidad con lo dispuesto en la Regla 13bisi, separadamente, y no con la descripción. Fecha de la recepción en la Oficina Internacional: 07 de Enero de 1998 (07.01.1998)

(54) Title: CANDIDA UTILIS TRANSFORMATION SYSTEM

(54) Título: SISTEMA DE TRANSFORMACION EN CANDIDA UTILIS

#### (57) Abstract

The present invention discloses a transformation system useful to express heterologous proteins in the Candida utilis yeast, based on obtaining auxotrophic mutants of said species as well as the isolation of different genes, from a genomic library, which complement said auxotrophies. The transformation system uses as hosts new auxotrophic mutants obtained from the yeast NRRL Y-1084 of Candida utilis which are defective mainly in the biosynthetic ways of uracyl and histidine, which are transformed with plasmids containing as selection markers the genes URA3 and HIS3 of Candida utilis. Another aspect of the invention is the isolation of the gene coding for the enzyme sucrose invertase or  $\beta$ -fructofuranosidase of Candida utilis, as well as the identification of sequences for promoting, secretion signalling and termination of said gene INVI. These sequences are useful to obtain the expression of heterologous proteins in said yeast.

#### (57) Resumen

La presente invención proporciona un sistema de transformación útil para expresar proteínas heterólogas en la levadura Candida utilis, basado en la obtención de mutantes auxotróficos de esta especie así como en el aislamiento de diferentes genes, a partir de una librería genómica, que complementan dichas auxotrofías. El sistema de transformación emplea como hospederos nuevos mutantes auxotróficos obtenidos a partir de la cepa NRRL Y-1084 de Candida utilis, los cuales son defectivos principalmente en las vías biosintéticas del uracilo y la histidina, los cuales son transformados con plásmidos que contienen como marcadores de selección los genes URA3 e HIS3 de Candida utilis. Otro aspecto de la invención es el aislamiento del gen codificante para la enzima sucrosa invertasa o  $\beta$ -fructofuranosidasa de Candida utilis, así como la identificación de secuencias promotoras, señales de secreción y terminadoras de dicho gen INVI. Estas secuencias pueden ser ventajosamente utilizadas para lograr la expresión de protéinas heterólogas en esta levadura.

## UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	
ΑT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Eslovaquia
ΑU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Senegal
ΑZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Мо́пасо	SZ TD	Swazilandia
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Chad
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Togo
BE	Bélgica	GN	Guinea	мк	ExRepública Yugoslava de		Tayikistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	.,,,,,	Macedonia	TM	Turkmenistán
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MI.	Malf	TR	Turquía
BJ	Benin	IE	Irlanda	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BY	Belarús	IS	Islandia	MW	Malawi	UG	Uganda
CA	Canadá	IT	Italia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CF	República Centroafricana	JР	Japón	NE	Niger	UZ	Uzbekistán
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Países Bajos	VN	Vict Nam
CH	Suiza	KG	Kirguistan	NO		YU	Yugoslavia
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Noruega Nucva Zelandia	zw	Zimbabwe
CM	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
CN	China	KR	República de Corea	PT			
CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Portugal		
CZ	República Checa	LC	Santa Lucía	RU	Rumania		
DE	Alemania	LI	Liechtenstein		Federación de Rusia		
ЭK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SD	Sudán		
EE	Estonia	LR	Liberia	SE	Suecia		
		LA	Pincila	SG	Singapur		

### SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN EN CANDIDA UTILIS.

#### Sector Técnico

La presente invención está relacionada con el campo de la ingeniería genética y la biotecnología, y en particular con el desarrollo de un sistema hospedero-vector para la transformación genética de la levadura Candida utilis, que permita la expresión y la secreción de proteínas heterólogas en esta levadura, las cuales puedan ser posteriormente utilizadas con diversos fines.

#### 10 Técnica Anterior.

La ingeniería genética y las biotecnologías en general han abierto un camino sin precedentes en la producción de compuestos de interés tanto desde el punto de vista médico, alimenticio o industrial, los cuales reportan grandes

15 beneficios al hombre.

La bacteria *Escherichia coli* ha sido durante algún tiempo el microorganismo más utilizado con estos fines por diversas compañías biotecnológicas, debido al conocimiento que se tiene en lo concerniente a su genética, su fácil manipulación y a sus sistemas de cultivo a gran escala.

- Sin embargo, las esperanzas de producción de proteínas de interés en este microorganismo se ven afectadas por diversos factores. En primer lugar, la presencia de pirógenos y compuestos tóxicos en la pared celular de Escherichia coli
- han originado regulaciones que limitan su uso, cuando los productos obtenidos son para uso médico o para la industria alimenticia. También las proteínas que son sobrexpresadas en E. coli generalmente aparecen en forma insoluble y no pueden ser secretadas. Por otra parte los mecanismos de transcripción, traducción y procesamiento postraduccional
- difieren de los presentes en organismos eucariotas, por lo

que las proteínas producidas difieren en alguna medida de las obtenidas a partir de fuentes naturales.

La posibilidad de producir proteínas heterólogas en sistemas eucariotas, tales como las levaduras, tiene algunas ventajas

- 5 con relación a los sistemas procariotas. Entre éstas podemos señalar la capacidad de crecer a altas densidades celulares y la posibilidad de adaptar su cultivo a sistemas continuos. Además las levaduras son capaces de secretar proteínas al medio de cultivo en considerable mayor cantidad en
- comparación con *E. coli*, y los medios de cultivos utilizados para el crecimiento de levaduras son más económicos que los utilizados en bacterias (Lemoine, Y., 1988. Heterologous expression in yeast. 8th International Biotechnology Symposium, París, July 17-22).
- 15 Además estos sistemas pueden llevar a cabo otras modificaciones postraduccionales como es el caso de la glicosilación, la cual está ausente en los sistemas bacterianos (Fiers, W., 1988. Engineering Maximal Expression of Heterologous Gene in Microorganism. 8th International
- Biotechnology Symposium, Paris, July 17-22). Además, estos sistemas generalmente tienen cierta preferencia por el mismo uso de codones utilizados por las células de los organismos superiores (Kigsman, S.M. et al., 1990. Heterologous Gene Expression in Saccharomyces cerevisiae, Biotechnology &
- Genetic Engineering Reviews, 3, Ed. G.E. Russell).

  Todo esto ha conducido al desarrollo y diseminación de nuevos sistemas de transformación, y con particular interés en las levaduras, como son los descritos primeramente para especies del género Saccharomyces, con especial énfasis en
- 30 Saccharomyces cerevisiae. Sin embargo, la expresión de proteínas en Saccharomyces ha afrontado problemas que van desde los bajos niveles de expresión obtenidos usando sus

promotores homólogos hasta la hiperglicosilación de los productos secretados al medio, es por esto que en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de levaduras no convencionales para su uso en la expresión de proteínas 5 heterólogas.

- El desarrollo de técnicas de transformación en otras levaduras no-Saccharomyces, como *Hansenula polymorpha, Pichia pastoris*, y levaduras del género Kluyveromyces (Sudbery, P., 1994. Yeast 10: 1707-1726) ha permitido un rápido avance en
- 10 el conocimiento y perfeccionamiento de estos sistemas, así como una mayor utilización de los mismos, tanto con fines vacunales, diagnósticos e industriales.

También dentro del género Candida se han reportado varios sistemas de transformación y de expresión como los reportados

- 15 para las levaduras *Candida tropicalis, Candida boidiini, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida maltosa* y *Candida albicans*, todas ellas con un marcado interés médico,

  debido a que muchas de estas especies son causantes de

  enfermedades oportunistas en humanos.
- Dentro del género Candida, la levadura Candida utilis, resulta particularmente interesante por sus características peculiares. En primer lugar, emplea un gran espectro de fuentes de carbono baratas como la xilosa, sacarosa, maltosa entre otras. Otra característica interesante es que es
- 25 posible producir eficientemente una gran cantidad de células en un cultivo continuo. Además, Candida utilis, al igual que Saccharomyces cerevisiae y Kluyveromyces lactis, han sido autorizadas por la FDA (Food an Drug Administration) como fuentes seguras en aditivos alimenticios. Al mismo tiempo,
- 30 Candida utilis ha sido utilizada como fuente para la producción industrial de L-glutamina, etil acetato, invertasa, entre otros productos.

Un sistema de transformación preliminar en Candida utilis ha sido descrito por Ho, I. et. al., 1984, (Biotechnology and Bioengineering Symp. 14: 295-301). En el mencionado trabajo no se presentan evidencias directas de la presencia del 5 marcador de resistencia al antibiótico, por lo que resulta incompleta la verificación directa de la transformación. Recientemente una nueva estrategia para un sistema trasformación para Candida utilis fue reportado por Kondo, K. et al., 1995, (J. Bacteriol. 177: 7171-7177). obtuvieron transformantes resistentes 10 a cicloheximida mediante el uso de un gen marcador que contiene una forma mutada del gen ribosomal L41 que confiere la resistencia. También utilizan fragmentos de ADN ribosomal (rADN) como blanco de múltiple integración, debido a que el marcador 15 necesita estar presente en múltiples copias para conferir

Sin embargo, hasta la actualidad, no existe ningún sistema de transformación en esta levadura basado en marcadores de auxotrofía debido a la inexistencia de mutantes para el desarrollo de dicho sistema.

Si tenemos en cuenta el conocimiento obtenido en su explotación industrial y su novedad desde el punto de vista genético, *Candida utilis* pudiera ser un organismo atractivo para su utilización comercial como sistema de expresión de 25 proteínas heterólogas.

## Divulgación de la invención.

resistencia.

El objetivo de la presente invención ha sido proporcionar un sistema de transformación que permita expresar proteínas heterólogas en la levadura *Candida utilis*, basado en la obtención de mutantes auxotróficos de esta especie así como en el aislamiento de los genes, a partir de una librería genómica, que complementan dichas auxotrofías.

El proceso de transformación descrito aquí proporciona medios para la introducción de fragmentos o secuencias de ADN en una cepa hospedera de *Candida utilis* y permite a esta levadura ser utilizada para la expresión y producción de proteínas. Al mismo tiempo el aislamiento de genes cuyas secuencias promotoras y terminadoras puedan servir para la expresión de genes heterólogos en dicha levadura, ha sido un propósito de esta invención.

Además, las células de levaduras transformadas pueden ser 10 identificadas y seleccionadas mediante los métodos descritos en la presente invención.

Nuevas cepas de *Candida utilis*, vectores y subclones son proporcionados. Las nuevas cepas son utilizadas como hospederos para la introducción de fragmentos de AND recombinante.

15

La invención también se relaciona con la transformación estable y el mantenimiento de dichos fragmentos de ADN en las células hospederas, donde el marcador es integrado por recombinación homóloga en el genoma de la levadura.

- Concretamente la invención consiste en un nuevo sistema de transformación de la levadura Candida utilis, el cual utiliza como hospederos nuevos mutantes auxotróficos aislados a partir de la cepa NRRL Y-1084 de dicha levadura. Estos mutantes son deficientes en la enzima orotidin-5 fosfato descarboxilasa de la vía de biosíntesis del uracilo o en la enzima imidazol glicerol fosfato deshidratasa de la vía biosintética de la histidina, los cuales fueron obtenidos mediante el uso de mutagénesis clásica provocada por agentes físicos y químicos conocidos a partir del estado del arte (Sherman, F. et al., 1986. Laboratory course: Manual for
- 30 (Sherman, F. et al., 1986. Laboratory course: Manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY). Estos mutantes presentaron una elevada

estabilidad (frecuencia de reversión aproximadamente de  $10^{-6}$ ) y pueden ser eficientemente transformados mediante el procedimiento descrito en la presente invención.

A su vez se aislaron como marcadores de selección para los nuevos mutantes de Candida utilis el gen URA3, codificante para la enzima orotidin 5'-monofosfato descarboxilasa y el gen HIS3 codificante para la enzima Imidazol-glicerol-fosfato deshidratasa, los cuales fueron aislados a partir de una genoteca de Candida utilis construida en el plásmido pUC19 e identificados por complementación de las mutaciones pyrF e hisb463 de las cepas de E. coli MC1066 y KC8 respectivamente. Igualmente el gen URA3 de C. utilis complementó la mutación URA3 de Saccharomyces cerevisiae SEY 2202.

La secuencia completa de los genes aislados fue determinada y 15 la secuencia aminoacídica predicha mostró una elevada similaridad con la del mismo gen proveniente de otras levaduras y hongos.

Los vectores integrativos construidos para realizar la transformación de este mutante fueron el pURA5 y el pUREC3.

- 20 Estos plásmidos contienen el gen *URA3* aislado de *Candida utilis* como marcador de selección, además de presentar regiones ADN cromosomal que se encuentran flanqueando al mismo, favoreciendo así la integración en el locus de *Candida utilis* mediante recombinación homóloga.
- Otro aspecto novedoso de la presente invención, es el aislamiento del gen que codifica para la enzima sacarosa invertasa o  $\beta$ -fructofuranosidasa (INVI) de Candida utilis, así como la identificación de las regiones promotoras, terminadoras y la secuencia señal de este gen, las cuales 30 igualmente pueden ser ventajosamente utilizadas en la

expresión de proteínas de diferentes orígenes en dicha levadura.

La presente invención también brinda una serie de vectores de expresión basados en el sistema descrito anteriormente, los cuales son utilizados para la transformación de los mutantes aislados a partir de *C. utilis* con vistas a la obtención de proteínas heterólogas.

El sistema de transformación de la presente invención utiliza como hospederos nuevos mutantes auxotróficos a partir de la cepa NRRL Y-1084 de *Candida utilis*, los cuales son defectivos fundamentalmente en la vía biosintética del uracilo y la histidina, dentro de los cuales fueron seleccionados por sus características el mutante CUT-35 para el uracilo, así como para la histidina el mutante TMN-3.

#### 15 EJEMPLOS DE REALIZACIÓN:

#### Ejemplo 1: Mutagénesis de Candida utilis

Con el objetivo de desarrollar un sistema de transformación en un microorganismo son generalmente requeridos tres elementos:

- 20 (1) un marcador de selección para la transformación, que puede ser un marcador de auxotrofía o un marcador dominante,
  - (2) un mutante hospedero adecuado para dicha selección y
  - (3) un método para ser capaz de transformar a este hospedero y que permita a éste adquirir de forma eficiente el ADN
- 25 extranuclear.

Con vistas a lograr el segundo objetivo se llevó a cabo una mutagénesis clásica en la levadura *Candida utilis*. Para esto cultivos de la cepa de levadura seleccionada (NRRL Y-1084), se inocularon en 100 ml de medio YPG (Extracto de levadura

30 1%, peptona 2%, glucosa 2%) y se incubaron en una zaranda a  $30^{\circ}\text{C}$  de 10--20 horas. Se tomaron 50 ml de cultivo y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente

las células se lavaron 2 veces con buffer citrato 0.1M (pH 5.5) estéril y se resuspendieron después en 50 ml del mismo buffer. A continuación, 10 ml de esta suspensión es tratada con una solución de NTG (Nitroso Guanidina) a una concentración final de 50 mg/ml. La suspensión en presencia del mutágeno se incubó durante 30 minutos a 30°C en reposo. El mutágeno es removido de la suspensión lavando 2 veces con agua destilada. Las células se resuspendieron en 50 ml de YPG y luego se transfirieron a un erlenmeyer con 100 ml de YPG.

10 Este cultivo de células mutagenizadas se incubó a  $30^{\circ}\mathrm{C}$  durante 48 horas.

#### Enriquecimiento con Nistatina.

Aproximadamente 5 ml del cultivo expresado durante 48 horas en YPG se usó para inocular 100 ml de medio mínimo. El medio mínimo (YNB; Yeast Nitrogen Base) utilizado para el enriquecimiento con el antibiótico no fue suplementado con el metabolito producido por la vía biosintética en la cual se busca el defecto. Por ejemplo, para el aislamiento de mutantes auxotróficos al uracilo, éste no se añade al medio.

La incubación se continuó hasta que la densidad óptica (DO) del cultivo alcanzó del 20 al 30 % de la DO inicial. Cuando el cultivo alcanzó la DO deseada, la suspensión celular se trató con 25 unidades/ml de una solución de nistatina. La solución tratada con el antibiótico se incubó a 30°C durante 30 minutos sin agitación. La nistatina se eliminó del medio lavando 2 veces la suspensión celular con agua destilada y después las células se resuspendieron en un volumen adecuado

#### Pesquisaje y Selección.

30 Las placas conteniendo las colonias mutagenizadas de acuerdo al enriquecimiento realizado en el ejemplo anterior se plaquearon en medio mínimo YNB con y sin uracilo. Las

para obtener de 150 a 200 colonias por placas.

colonias que no crecieron en ausencia de uracilo fueron tomadas para análisis posteriores.

Específicamente para identificar la presencia mutantes ura3 y ura5, las células fueron crecidas en presencia del compuesto tóxico ácido 5-fluorótico (5-FOA). Las colonias resistentes se seleccionaron como mutantes ura3 o ura5.

## Ejemplo 2: Aislamiento de mutantes ura3.

Después del enriquecimiento con nistatina el cultivo fue lavado dos veces con  $H_2\mathcal{O}$  destilada y diseminado directamente

- 10 sobre placas de YNB conteniendo 0.75 µg/ml de 5-FOA (5-fluoro-orotic acid; Fluka) y 40 µg/ml de uracilo. Las placas se incubaron durante cuatro días y las colonias que crecieron en las mismas fueron analizadas para comprobar el fenotipo ura. De las 4 x 10° células viables, después del
- enriquecimiento en nistatina, 79 colonias mostraron resistencia al 5-FOA. Estas colonias podrían ser *URA3*, *ura5*, o simplemente resistente al 5-FOA. Para confirmar la auxotrofía al uracilo, los supuestos mutantes fueron punteadas sobre placas de medio YPG e incubadas durante 48
- 20 horas a 30°C. Estas placas de YPG se replicaron sobre medio mínimo YNB con y sin uracilo, obteniéndose 67 mutantes con fenotipo ura.

A estos mutantes les fue chequeada la frecuencia de reversión destacándose un grupo de alrededor de 23 mutantes por presentar una frecuencia de reversión del orden de 10<sup>-8</sup>, lo que les confiere una aceptable estabilidad como hospederos con vistas a ser transformados.

Los mutantes auxotróficos ura así obtenidos, se les chequeó la actividad ODCasa (actividad del producto del gen URA3),

30 por el método descrito por Yoshimoto et. al., 1978 (Methods Enzymol. 51: 74-79), así como se les determinó a 8 de ellos

sus parámetros de crecimiento. Los resultados de la frecuencia de reversión, así como estas últimas características determinadas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de las características de los mutantes ura3 5 más significativos.

Nombre	Frecuencia	Actividad	Crecimiento
	de Reversión	OMPDCasa	
CUT35	$< 5 \times 10^{-7}$	-	+++
CUT43	< 1×10 <sup>-7</sup>	_	+++
CUT61	< 1×10 <sup>-8</sup>		+++
CUT65	< 1×10 <sup>-e</sup>	-	++
CUT70	< 1×10 <sup>-8</sup>	_	+
CUT88	$< 7 \times 10^{-7}$	_	+++
CUT93	1×10 <sup>-8</sup>	-	+++
CUT166	6x10 <sup>-8</sup>		+++

Ejemplo 3: Aislamiento de otros mutantes distintos del fenotipo ura.

Con vistas de contar con una variedad de mutantes auxotróficos diferentes de uracilo, la suspensión celular 10 obtenida de acuerdo al enriquecimiento con nistatina, se diseminó en placas de YPG, las que fueron incubadas a 30°C durante 50 horas. Posteriormente, las colonias contenidas en las placas de YPG se replicaron sobre placas conteniendo medio mínimo YNB, y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Las colonias que no crecieron en las placas de YNB fueron tomadas para análisis posteriores.

Como resultado de esto fueron chequeadas alrededor de 2411 colonias y se obtuvo un 2% de aparición de mutantes auxotróficos. Estos mutantes fueron chequeados a través del 20 test de Holliday y del test de Finchan, de donde se obtuvo que el 90% de los mutantes obtenidos respondió al fenotipo his, el 2% al fenotipo lys, el 1% al fenotipo leu, el 1% al

fenotipo met, el 1% al fenotipo ade, y el 5% no mostró un fenotipo auxotrófico simple (Naa).

A los mutantes obtenidos se les chequeó la frecuencia de reversión, seleccionándose así los más estables por presentar  $^{5}$  una frecuencia de reversión entre  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de reversión de los mutantes diferentes de uracilo más significativos.

Nombre	Fenotipo	Frecuencia
TMN3	his -	de Reversión 1x10 <sup>-8</sup>
TMN31	his	1×10 <sup>-8</sup>
TMN64	his	1×10 <sup>-5</sup>
TMN9	his	$4 \times 10^{-7}$
TMN12	his -	$5 \times 10^{-7}$
TMN13	his	$2.5 \times 10^{-7}$
TMN62	his -	8×10 <sup>-7</sup>
TMN74	his	2×10 <sup>-7</sup>
TMN78	his	$2 \times 10^{-7}$
TMN45	lys	8×10 <sup>-6</sup>
TMN71	his	2×10 <sup>-€</sup>
TMN82	Naa	2×10 <sup>-6</sup>

Ejemplo 4: Construcción de una librería genómica de Candida utilis.

10 El ADN cromosomal extraído de Candida utilis NRRL Y-1084 se digirió parcialmente con la enzima Sau3A y los fragmentos de tallas comprendida entre 6 y 9 kb fueron aislados mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (LGT). Estos fragmentos se ligaron al vector pUC19 previamente digerido con la enzima de restricción BamHI y tratado con fosfatasa alcalina. Esta ligazón se transformó en la cepa de Escherichia coli MC 1066 (F', D Lac x74, hsr, hsm, rps1, galU, galK, trip C 9030F, leuB,

pyrF::tn5). Aproximadamente 95% de recombinantes fueron obtenidos en la librería genómica.

#### Ejemplo 5: Aislamiento del gen URA3 de Candida utilis.

Con vistas a encontrar fragmentos de ADN de Candida utilis que complementen la mutación pyrF de la cepa de Escherichia coli MC1066, alícuotas de la transformación anterior fueron plaqueadas en medio completo (LBA) y las colonias crecidas fueron replicadas en medio selectivo con el objetivo de encontrar individuos recombinantes que complementen en esta cepa de Escherichia coli, considerando que el gen URA3 de Saccharomyces cerevisiae complementa dicha mutación en E. coli.

De los individuos que complementaron se tomaron alrededor de 12 colonias, se purificó el plásmido y se rechequeó por transformación en esta cepa de *Escherichia coli* MC1066 que la restauración del fenotipo *URA3* está asociado a la presencia del plásmido.

15

Paralelamente a estos plásmidos se le realizó un análisis de restricción con las enzimas HindIII y EcoRI que permitió 20 identificar individuos recombinantes con fragmentos de 2.6 kb aproximadamente donde se encuentra contenido el gen URA3 de Candida utilis. Como resultado de este análisis se escogieron dos plásmidos, llamados pURA2 y pURA5 a los cuales se les realizó un mapa de restricción con vistas a identificar los 25 sitios presentes en el fragmento clonado. En la Figura 1 se muestra el mapa del plásmido pURA5. Este plásmido posteriormente usado para posteriores análisis de complementación y secuencia.

# Ejemplo 6: Acotamiento y secuenciación del gen URA3 de 30 Candida utilis.

El plásmido pURA5 fue digerido con varias enzimas de restricción de acuerdo a los sitios presentes en el vector de

la genoteca pUC19. Con vistas al acotamiento del gen URA3 de Candida utilis los fragmentos correspondientes a las digestiones EcoRI (1,9 kb), HincII (1,5 kb), SacI (1,1kb) fueron subclonados en pBluescript SK(+) dando lugar a los plásmidos pUREc-3, pURHinc-1 y pURSac-4, respectivamente. De dichos plásmidos solo el pURSac-4 no fue capaz de complementar la mutación pyrF de Escherichia coli (Figura 2). El fragmento EcoRI de 1,9 kb (pUREc-3, Figura 3) conteniendo el gen URA3 de Candida utilis fue secuenciado doble RAMIFICACIÓN por el método de Sanger et. al. (1977, Proc.

Para ello se usaron tanto oligos universales de las series M13mp/pUC, así como oligos internos derivados de la secuencia. La secuencia completa de 1179 pb del fragmento

Natl. Acad. Sci USA 74: 5463-5467).

10

- 15 EcoRI es mostrada en la Figura 4 (No. Id. Sec.: 1, 2). Dicho fragmento contiene un marco abierto de lectura de 800 pb (266 codones). El gen URA3 de Candida utilis codifica para una proteína de masa molecular teórica 29 436 Da. La secuencia nucleotídica flanqueante al codón de iniciación ATG (GAAAATG)
- corresponde bien con la consenso reportada en levadura (A/YAA/YAATG), por Cigan y Donehue, 1987 (Gene 59: 1-18).

  La región 3'-no traducida contiene una posible señal de poliadenilación TATAAAA (consenso AATAAAA) encontrada en la región 3' terminal de la mayoría de los genes eucarióticos
  - Ejemplo 7: Análisis de complementación en Saccharomyces cerevisiae.

(Guo, Z y Sherman, F., 1995. Mol. Cell. Biol. 15: 5983-5990).

Con el objetivo de verificar que el fragmento clonado corresponde al gen *URA3* de *Candida utilis* y no a un fragmento de ADN con actividad supresora, el fragmento de 2,8 kb KpnI/XbaI del plásmido pURA5 se clonó en un vector derivativo de pBR322 (pBSARTR-3). El vector pBSARTR 3 contiene una

secuencia de replicación autónoma (ARS1) y el marcador de selección TRIP1, ambos de Saccharomyces cerevisiae. Como resultado se obtuvo el vector pUT64 para Saccharomyces cerevisiae (Figura 5) el cual fue usado para transformar la cepa Saccharomyces cerevisiae SEY2202 (URA3-52-, leu2-112,his3-) usando el método de Acetato de Litio reportado previamente por Ito. et. al., 1983 (J. Bacteriol. 153: 163-168).

Los transformantes se obtuvieron a las 48 horas de haberse 10 realizado la transformación y la presencia del plásmido fue chequeada por hibridación de colonias y experimentos de southern-blot.

La frecuencia de transformación obtenida  $(2-5 \times 10^{2})$  transf/mg) se correspondió con lo reportado en la literatura

para otros marcadores auxotróficos obtenidos en levaduras.

Consecuentemente se demostró por complementación que el gen URA3 de Candida utilis es capaz de complementar la mutación URA3 de Saccharomyces cerevisiae.

Ejemplo 8: Transformación de Candida utilis NRRL Y-1084

20 CUT35 con los plásmidos pURA y mediante el método de acetato de litio.

La cepa mutante ura3 de Candida utilis CUT35 (Número de Depósito Pendiente) se transformó mediante el método de acetato de litio reportado por Ito. et. al. (1983, J.

- 25 Bacteriol. 153: 163-168) y utilizando como marcador de selección el gen *URA3* de *Candida utilis* aislado previamente. La transformación con los plásmidos pURA5 y puC*URA3* portadores del gen *URA3* de *Candida utilis* fue realizada mediante la integración de dicho gen por recombinación 30 homóloga en la región correspondiente del genoma de *Candida*
- 30 homóloga en la región correspondiente del genoma de *Candida utilis*. El plásmido pUC*URA3* fue obtenido mediante la clonación del fragmento EcoRI de 1.9 kb del gen *URA3* de

Candida utilis en el vector pUC19 (Figura 6). Para ello, los plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción XhoI la cual se encuentra hacia el extremo del gen estructural. La linealización del plásmido favorece la integración homóloga en el locus genómico

El procedimiento de transformación utilizado, que se basa en el tratamiento de las células intactas de levaduras con cationes de metales alcalinos, es básicamente el mismo utilizado para Saccharomyces cerevisiae, con 50 mM de Acetato de Litio en lugar de 100 mM. La selección de los transformantes se realizó en medio mínimo YNB carente de uracilo. La estabilidad de mitótica de estos transformantes es alta, debido al mecanismo de integración homóloga. La frecuencia de transformación coincide con lo reportado para plásmidos integrativos de Saccharomyces cerevisiae y otras levaduras no convencionales usando vectores integrativos (Tabla 3).

Ejemplo 9: Transformación de Candida utilis NRRL Y-1084 con los plásmidos pURA5 y pUCURA3 mediante el método de 20 electroporación.

La cepa mutante ura3 de Candida utilis CUT35 se transformó mediante el método de electroporación reportado por Kondo, K. et al., 1995, (J. Bacteriol. 177: 7171-7177) y utilizando como marcador de selección el gen URA3 de Candida utilis aislado previamente. La transformación con los plásmido pURA5 y puCURA3 portadores del gen URA3 de Candida utilis fue realizada mediante integración de dicho gen por recombinación homóloga en la región correspondiente del genoma de Candida utilis.

30 El procedimiento de transformación utilizado se basa en el tratamiento de las células intactas de levaduras con un campo eléctrico fijado a las siguientes condiciones 0,7 kV (3,5

kV/cm), una resistencia de 800  $\Omega$  y una capacitancia de 25  $\mu_{\text{F}}$ .

Previamente a la transformación, ambos plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción XhoI la cual se 5 encuentra hacia el extremo del gen estructural lo que favorece el evento de integración homóloga.

La selección de los transformantes se realizó en medio mínimo YNB (Yeast Nitrogen Base) carente de uracilo.

La frecuencias de transformación tanto con el plásmido pURA5 10 como con el pUC*URA3* mediante este método, comparativamente con el de acetato de litio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2. Frecuencias de transformación obtenidas en la transformación de la cepa de *Candida utilis* CUT35 por diferentes métodos.

15 En todos los casos los plásmidos fueron digeridos con XhoI ya que con plásmidos circulares no se obtuvieron transformantes.

Frecuencia de transformación Concentración de Vector (# transf./µg) ADN (Hg) LiAc Electroporación 0.1 70-90 pUCURA-3 0.5 640 3.0 22 0.1 40-50 pURA-5 0.5 670 3.0 21

Tabla 3

La estabilidad mitótica de estos plásmidos es alta, debido al 20 mecanismo de transformación.

La frecuencia de transformación coincidió con lo reportado para plásmidos integrativos en *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras no convencionales.

En la Figura 7 se muestra el esquema de integración de los posibles eventos de integración en el genoma de Candida como el Southern-blot de algunos utilis así transformantes obtenidos.

#### Ejemplo 10: Aislamiento del gen HIS3 de Candida utilis.

10

25

El gen HIS3 de Candida utilis fue aislado y caracterizado a partir de la genoteca previamente descrita en el Ejemplo 4. Fragmentos de ADN, los cuales contienen el gen HIS3 de Candida utilis, fueron aislados a partir de una librería genómica por su posibilidad de complementar la mutación hisB463 de Escherichia coli KC8 (hsd, hisB463, pyrF::Tn5 Km<sup>r</sup>, trp (9830 (lact YA), stm, galU, gal), tomando en consideración que el gen HIS3 de Saccharomyces cerevisiae complementa la mutación hisb463 of Escherichia coli, usando 15 secuencias fortuitas del promotor en Escherichia coli.

Para aislar el gen que codifica para la enzima Imidazol glicerol fosfato deshidratasa de Candida utilis, se sembraron aproximadamente 10<sup>5</sup> células transformantes en medio selectivo suplementado con uracilo, leucina y triptofano. Se 20 extrajo ADN plasmídico de colonias capaces de crecer en este medio y por consiguiente capaces de complementar la mutación hisb463 de la cepa Escherichia coli KC8. Los plásmidos obtenidos fueron usados para retransformar la Escherichia coli KC8. Todos los plásmidos capaces de suplir el requerimiento de histidina fueron denominados pHCU. Para confirmar que las colonias his contenían el gen HIS3 de Candida utilis y no un fragmento de ADN con actividad supresora, dos de los plásmidos obtenidos a partir de los transformantes his (pHCU37 y pHCU40) se sometieron a una 30 reacción de PCR. Para esto se emplearon dos oligonucleótidos degenerados, diseñados a partir de dos regiones altamente

conservadas en 5 secuencias de IGPDasas correspondientes a

levaduras y hongos filamentosos y teniendo en cuenta el uso de codones de *Candida utilis*. La secuencia peptídica predicha, así como la secuencia oligonucleotídica se muestran en la Figura 8.

- 5 Una banda de PCR de aproximadamente 500 pb que por Souther-blot demostró que hibrida con el ADN genómico de Candida utilis, fue clonada en T-Vector (pMOSBLUE, Amershan) y la secuencia aminoacídica predicha de su secuencia nucleotídica resultó altamente homóloga a His3p de otras levaduras y
- 10 hongos. El plásmido pHCU 37 (Figura 9), fue usado para la determinación de la secuencia del gen HIS3 de Candida utilis.

#### Ejemplo 11: Secuenciación del gen HIS3 de Candida utilis.

- El gen HIS3 de Candida utilis se secuenció completamente doble RAMIFICACIÓN por el método de Sanger et. al. (1977). Se
- 15 emplearon oligonucleótidos universales de las series M13mp/pUC. Un total de 1190 pb del plásmido pHCU37 fueron secuenciados comenzando inicialmente con oligos diseñados teniendo en cuenta el fragmento de PCR previamente clonado. Para el completamiento de la secuencia del gen se
- 20 sintetizaron oligonucleótidos internos diseñados a partir de la secuencia obtenida inicialmente. La secuencia completa del gen se muestra en la Figura 10 (No. Id. Sec.: 5, 6).
  - El gen HIS3 de Candida utilis codifica para una proteína de masa molecular teórica de 24 518 Da.
- 25 Ejemplo 12: Aislamiento del gen INV1 que codifica para la invertasa de Candida utilis.
  - Con el objetivo de aislar el gen INVl que codifica para la invertasa de *Candida utilis* se aprovechó el hecho que la secuencia aminoacídica de esta enzima presenta regiones
- 30 altamente conservadas entre las especies, sobre esta base se las secuencias de las  $\beta$ -frctofuranosidasas de levaduras

fueron alineadas. Dos oligonucleótidos degenerados usados en dicho PCR fueron diseñados según el uso de codones en Candida utilis. La secuencia peptídica así como la de los oligos degenerados se muestra en la Figura 11.

- 5 El PCR generó una banda de 417 pb que fue subclonada en el Vector-T (pMOSBlue, Amersham). Dicha banda fue completamente secuenciada y la traducción de dicho fragmento de ADN corroboró la presencia de las regiones consenso además de una alta homología con las invertasas reportadas en la
- .0 literatura. Esto demostró que el fragmento aislado era perteneciente al gen *INVl* que codifica para una invertasa en *Candida utilis*. Este fragmento se utilizó como sonda para aislar el gen *INVl* de *Candida utilis*.
- Luego del pesquizaje de la librería de *Candida utilis*, un total de 6 clones conteniendo el gen INV1 de Candida utilis fueron aislados. Se seleccionaron 2 de los clones por su talla para el proceso de secuenciación (pCI-6 y pCI-12) usando un PCR utilizando los oligos usados en el aislamiento del fragmento anterior. Estos oligos fueron usados para iniciar la secuencia entera del gen por ambas cadenas del

#### Ejemplo 13: Secuenciación del gen INV1 de Candida utilis.

plásmido pCI-6.

Un total de 2607 pb del clon pCI-6 que contiene el gen INVI que codifica para la invertasa de Candida utilis fue secuenciado completamente doble RAMIFICACIÓN por el método de Sanger et. al., (1977), para esto se usaron tanto oligos universales de las series M13mp/pUC así como oligos internos derivados de la secuencia. La secuencia completa del fragmento de 2607 pb es mostrada en la Figura 12 (No. Id.

30 Sec.: 5, 6). Dicho fragmento contiene un marco abierto de lectura de 1602 pb (534 codones). El gen *INV1* de *Candida* 

utilis codifica para una proteína de masa molecular teórica 60 703 Da.

Teniendo en cuenta que la invertasa de Candida utilis es una enzima periplasmática, debe tener en su extremo N-terminal una señal peptidica. Analizando la secuencia hacia el extremo 5º del gen revelan dos codones ATG (ATG1 and ATG2 en la Figura 12) dando lugar a ORF codificantes para proteínas que difieren solamente en el tamaño de sus extremos N-terminales. Aplicando el algoritmo de von Heijne G. (1986, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690) para predecir el sitio de corte de la señal peptidasa de la proteína madura derivada de ambos ATG revelan que en ambos casos el sitio de corte esta ubicado entre los mismos residuos (S39 y S40 para ATG1 y S26 y S27 para ATG2), dando lugar a péptidos señales de 39 y 26 aminoácidos respectivamente. Teniendo en cuenta el tamaño promedio de las secuencias señales en levadura (estimado

alrededor de 20 residuos), podemos sugerir que el codón de iniciación del gen *INV1* es el segundo ATG.

Once sitios potenciales de N-glicosilación acorde a la regla

general N-X-T/S, se encuentran en las asparaginas de las posiciones 40, 88, 141, 187, 245, 277, 344, 348, 365, 373, 379 y 399 de la secuencia de la proteína madura.

La región 5'-no traducida muestra dos posibles cajas TATA (consenso TATAA), en las regiones -18 a -14 y -212 a -208,

25 además de varios posibles sitios de unión del represor Migl (consenso SYGGRG).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.

Figura 1. Plásmido pURA5, resultante de la genoteca de Candida utilis, donde se identificó el fragmento de ADN de 30 Candida utilis que complementa una mutación pyrF en Escherichia coli MC1066 y URA3 de Saccharomyces cerevisiae SEY 2202.

- Figura 2. Ubicación, mapa de restricción y análisis de complementación del gen *URA3* de *Candida utlilis*. Estrategia de secuenciación de dicho gen.
- Figura 3. Plásmido pUREC3, obtenido a partir de una digestión con la enzima de restricción EcoRI en el plásmido pURA5 y capaz de complementar la mutación URA3 de Saccharomyces cerevisiae.
  - Figura 4. Secuencia de ADN correspondiente al fragmento que contiene el gen URA3 de Candida utilis.
- 10 **Figura 5**. Plásmido pUT64 obtenido para los experimentos de complementación de la mutación *ura3* en *Saccharomyces* cerevisiae.
  - Figura 6. Mapa del plásmido pUC*URA3* utilizado en los experimentos de transformación de la levadura *Candida utilis*.
- 15 **Figura 7**. (A) Esquema de los posibles eventos de integración durante la transformación
  - (B) Southern-blot de algunos de los transformantes.
  - Figura 8. Secuencia de peptídica y de ADN correspondiente a los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR para el aislamiento del gen HIS3 de Candida utilis.

20

- Figura 9. Plásmido pHCU37, resultante de la genoteca de Candida utilis, que contiene un fragmento capaz de complementar la mutación hisB463 de Escherichia coli KC8.
- Figura 10. Secuencia de ADN correspondiente al fragmento que 25 contiene el gen HIS3 de *Candida utilis*.
  - Figura 11. Secuencia peptídica y de ADN correspondiente a los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR para el aislamiento del gen *INV1* de *Candida utilis*.
- Figura 12. Secuencia de ADN correspondiente al fragmento que contiene el gen INV1 de Candida utilis.

#### LISTA DE SECUENCIAS

_	(1) INFORMACIÓN GENRAL:
5	<ul><li>(i) SOLICITANTE:</li><li>(A) NOMBRE: CENTRO DE INGENIERIA GENTICA Y BIOTECNOLOGIA</li><li>(B) DIRECCIÓN: AVE. 31 ENTRE 158 Y 190, CUBANACAN, PLAYA.</li></ul>
10	(C) CIUDAD: CIUDAD DE LA HABANA (D) ESTADO: CIUDAD DE LA HABANA (E) PAÍS: CUBA (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 12100
15	(G) TELÉFONO: 53 7 216013 (H) TELEFAX: 53 7 336008
	(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: SISTEMA DE TRANFORMACIÓN EN CANDIDA UTILIS.
20	(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 6
	(iv) FGPMA LEGIBLE PRO MÁQUINA:  (A) TIPO DE SOPORTE: Disco flexible  (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
25	<pre>(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DCS/MS-DOS (D) SOPORTE LÓGICO: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)</pre>
30	(vi) DATOS DE SOLICITUD DE PRIORIDAD:  (A) NÚMBERO DE SOLICITUD: 82/96  (B) FECHA DE SOLICITUD: 03-OCT-1996
30	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO. 1:
	(2) INFORMACION PARA LA SEC 10 NO. 1:
35	<ul> <li>(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:         <ul> <li>(A) LONGITUD: 1179 pares de base</li> <li>(B) TIPO: ácido nucleico</li> <li>(C) RAMIFICACIÓN: simple</li> <li>(C) TOPOLOGÍA: lineal</li> </ul> </li> </ul>
40	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
	(iii) HIPOTÉTICA: NO
45	(iv) ANTI-SENTIDO: NO
10	(vi) FUENTE ORIGINAL:  (A) ORGANISMOO: Candida utilis  (B) CEPA: NRRL Y-1084
50	(ix) RASGOS:  (A) NOMBRE/CLAVE: PÉPTIDOO MADURO  (E) LOCALIZACIÓN:11179  (D) OTRA INFORMACIÓN:/producto= "Orotidin 5'-monofosfato
55	descarboxilasa" /gen= " <i>URA3</i> "

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NO. 1:

	CAAATAGCTC	TOTACTTGOT	TCTGCTCAAC	AAGCTGCTGG	AACTGCTGCT	GCTCTTTTGG	60
5	GTTCAATTGG	TCCATCCTTG	CTACTTTTCC	GCCTAGTTTC	GATTCCGATT	CTGATAGAGA	120
	AGCCCAGCTA	TGAATGGAAG	AAATTTTTCA	CTTTTGTATG	TCCTTTTTT	CACGCTTCGT	180
10	TGCTTCGGAC	AAAAAAATAG	TGGAGGCACT	CGGTGGAGGG	AAGCTATCCT	CGAGATGAAA	240
<u>.</u> 0	AATTTCAAGC	TCATCTCATC	GTCCAAGTGG	GACNGCNAGC	TGAGGCTTCT	GAAGAGGTTG	300
	AGGAAAATGG	TCACCACGTT	ATCGTACACA	GAGAGGCAT	CGCACCCTTC	GCCACTTGCT	360
15	AAGCGTCTGT	TTTCGCTTAT	GGAGTCCAAG	AAGACGAACC	TGTGTGCCAG	TGTCGATGTT	420
	CGTACCACAG	AGGAGTTGCT	CAAGCTCGTT	GATACGCTTG	GTCCTTATAT	CTGTCTGTTG	480
20	AAGACGCATA	TTGATATCAT	TGATGACTTC	TCTATGGAGT	CTACTGTGGC	TCCACTGTTG	540
20	GAGCTTTCAA	AAGAGCACAA	TTTCCTCATC	TTTGAGGACC	GTAAGTTTGC	TGATATCGGC	600
	AACACCGTCA	AGGCACAGTA	CGCCGGTGGT	GCGTTCAAGA	TTGCACAATG	GGCAGACATC	660
25	ACCAACGCCC	ACGGTGTCAC	CGGTCGAGGT	ATCGTCAAGG	GGTTGAAGGA	GGCTGCACAG	720
	GAAACCACGG	ATGAGCCAAG	AGGGCTGTTG	ATGCTTGCTG	AGCTAAGCTC	CAAGGGCTCC	780
30	TTCGCTCACG	GGACATATAC	CGAGGAGACC	GTGGAGATTG	CCAAAACTGA	TAAGGACTTT	840
	TGTATTGGAT	TCATCGCACA	GAGAGACATG	GGTGGCAGAG	AAGATGGGTT	CGACTGGATC	900
	ATCATGACAC	CAGGCGTGGG	ACTCGACGAT	AAGGGCGACT	CCCTGGGCCA	ACAGTACAGA	960
35	ACTGTCGATG	AGGTTGTCAG	TGGTGGCTGT	GACATCATCA	TCGTTGGTAG	AGGCTTGTTT	1020
	GGAAAGGGAA	GAGATCCAAC	AGTGGAAGGT	GAGCGTTATA	GAAAAGCAGG	CTGGGATGCT	1080
40	TATCTCAAGA	GATACTCAGC	TCAATAAACG	TTGAGCTCTG	GCTTGTATAG	GTTCACTTGT	1140
	ATAAAATGTT	CATTACTGTT	TTCGGAAGTT	GTAGATTGC			1179

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO. 2:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 266 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoacídica
- (C) RAMIFICACIÓN: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- 55 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
  - (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Candida utilis (B) CEPA: NRRL Y-1084 (ix) RASGOS: (A) NOMBRE/CLAVE: PROTEÍNA 5 (B) LOCALIZACIÓN:1..266 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 2: Met Val Thr Thr Leu Ser Tyr Thr Glu Arg Ala Ser His Pro Ser Pro 10 Leu Ala Lys Arg Leu Phe Ser Leu Met Glu Ser Lys Lys Thr Asn Leu 15 Cys Ala Ser Val Asp Val Arg Thr Thr Glu Glu Leu Leu Lys Leu Val Asp Thr Leu Gly Pro Tyr Ile Cys Leu Leu Lys Thr His Ile Asp Ile 20 Ile Asp Asp Phe Ser Met Glu Ser Thr Val Ala Pro Leu Leu Glu Leu 25 Ser Lys Glu His Asn Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly Asn Thr Val Lys Ala Gln Tyr Ala Gly Gly Ala Phe Lys Ile 30 Ala Gln Trp Ala Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Thr Gly Arg Gly Ile Val Lys Gly Leu Lys Glu Ala Ala Gln Glu Thr Thr Asp Glu Pro 35 Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Gly Ser Phe Ala 155 40 His Gly Thr Tyr Thr Glu Glu Thr Val Glu Ile Ala Lys Thr Asp Lys 170 Asp Phe Cys Ile Gly Phe Ile Ala Gln Arg Asp Met Gly Gly Arg Glu 185 45 Asp Gly Phe Asp Trp Ile Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp 200 Lys Gly Asp Ser Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Thr Val Asp Glu Val Val 50 215 Ser Gly Gly Cys Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Gly Lys 55 Gly Arg Asp Pro Thr Val Glu Gly Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp

245

250

Asp Ala Tyr Leu Lys Arg Tyr Ser Ala Gln 260 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO. 3: 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 1190 pares de base (B) TIPO: ácido nucleico (C) RAMIFICACIÓN: simple 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal (ii) MOLECULE TIPO: ADN (genómico) (iii) HIPOTÉTICA: NO 15 (iv) ANTI-SENTIDO: NO (vi) FUENTE ORIGINAL: (A) ORGANISMO: Candida utilis 20 (B) CEPA: NRRL Y-1084 (ix) RASGOS: (A) NOMBRE/CLAVE: péptido maduro (B) LOCALIZACIÓN:1..1190 25 (D) OTRA INFORMACIÓN:/producto= "Enzima Imidazol-glicerol-fosfato deshidratasa" /gen= "HIS3" 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 3: ACCTCCCAAT CGCACAGGCA ACGATACAAA TTCAACGAGT ATTAACCATC TTGTGTGCTA 60 AAAAGAGTCG AAGAACAACA GTGCGCCAAA AAAAAAACTC CGGACCGCAC ACGACTCATC 120 35 GCTCTCGGAA TATCCCTCGG AATGCGCCAC TTCCGGGTGC GTGGCCATCG GAAGAGCGAA 180 GAGTCATCAC CATCGTACTT TAACGACTTA CTATTCTCAT TGAGTATTGA GAAGAAGGAT 240 AGAGAAATGG CTGAACGAAC GGTGAAACCC CAGAGAAGAG CTCTTGTGAA TCGTACAACA 300 AACGAAACGA AGATCCAGAT TTCCTTGAGT TTGGATGGTG GATACGTAAC GGTTCCGGAG 360 TCAATCTTCA AGGATAAGAA GTACGACGAT GCTACTCAAG TCACCTCTTC TCAGGTGATT 420 45 TCAATCAACA CGGGCGTTGG ATTCCTGGAC CACATGATCC ATGCTCTTGC GAAGCATGGT 480 GGGTGGAGTT TGATTGTGGA GTGTATTGGT GATTTGCACA TTGACGACCA CCACACCACC 540 50 GAGGACGTTG GTATTGCGCT GGGAGACGCC GTCAAGGAGG CCTTGGCATA TAGAGGTGTC 600 AAGAGATTTG STAGCGGGTT TGCTCCATTG GACGAGGCTC TGAGCAGAGC CGTTGTTGAT 660

CTGAGTAACC GTCCGTTTGC CGTTGTTGAG CTGGGGACTCA AGAGGGAAAA GATCGGTGAC

TTGTCATGTG AGATGATTCC TCACTTCTTG GAGAGTTTTG CCCAAGCAGC TCATATCACG

55

720

780

840

900

960

1020

1080

1140

1190

ATGCATGTTG ACTGTTTGAG AGGCTTCAAC GACCATCACA GAGCTGAATC CGCATTCAAG GCCCTGGCAG TCGCCATTAA GGAATCCATC TCCAGTAACG GCACCAATGA TGTTCCCTCA 5 ACAAAGGGTG TTTTGTTCTA GATAGCAGTC TTTCTGTCTC TCTATTTATT CGATAAATAA GAACTATGTA TATCTTTCTC TTTTAATTGT ATATGTACAT GCACAGCTGA CTTCATCAAC GGAAGATGTT ATTGAGTGCA GCCATTGTCT GACTGTCGTT ATCCTTCTTT GCGGATTTAC 10 CAAGGACTCT ACGACCACTG GTGGCTTTGA TATGATTTCC TGCCAGTACT TGTAAGAGGT GCAACGTCAA TGGAAACGGC ACCGTTAGCC TTGATGGTTG CACGGGTAGG 15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO. 4: (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 210 aminoácidos (B) TIPO: aminoacídica 20 (C) RAMIFICACIÓN: simple (D) TOPOLOGÍA: lineal (ii) TIPO DE MOLÉCULE: PROTEÍNA 25 (iii) HIPOTÉTICA: NO (iv) ANTI-SENTIDO: NO (vi) FUENTE ORIGINAL: (A) ORGANISMO: Candida utilis 30 (B) CEPA: NRRL Y-1084 'ix) RASGOS: (A) NOMBRE/CLAVE: PROTEÍNA 35 (B) LOCALIZACIÓN:1..210 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 4: 40 Met Ala Glu Arg Thr Val Lys Pro Gln Arg Arg Ala Leu Val Asn Arg 5 Thr Thr Asn Glu Thr Lys Ile Gln Ile Ser Leu Ser Leu Asp Gly Gly 45 Tyr Val Thr Val Pro Glu Ser Ile Phe Lys Asp Lys Lys Tyr Asp Asp 35 40 45 Ala Thr Gln Val Thr Ser Ser Gln Val Ile Ser Ile Asn Thr Gly Val 50 Gly Phe Leu Asp His Met Ile His Ala Leu Ala Lys His Gly Gly Trp 70 75 55 Ser Leu Ile Val Glu Cys Ile Gly Asp Leu His Ile Asp Asp His His 8.5 90

Thr Thr Glu Asp Val Gly Ile Ala Leu Gly Asp Ala Val Lys Glu Ala

100 Leu Ala Tyr Arg Gly Val Lys Arg Phe Gly Ser Gly Phe Ala Pro Leu 5 115 Asp Glu Ala Leu Ser Arg Ala Val Val Asp Leu Ser Asn Arg Pro Phe 135 140 Ala Val Val Glu Leu Gly Leu Lys Arg Glu Lys Ile Gly Asp Leu Ser 10 Cys Glu Met Ile Pro His Phe Leu Glu Ser Phe Ala Gln Ala Ala His 165 170 15 Ile Thr Met His Val Asp Cys Leu Arg Gly Phe Asn Asp His His Arg Ala Glu Ser Ala Phe Lys Ala Leu Ala Val Ala Ile Lys Glu Ser Ile 195 200 205 20 Ser Ser 210 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 5: 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 2607 pares de base (B) TIPO: ácido nucleico (C) RAMIFICACIÓN: simple 30 (D) TOPOLOGÍA: lineal (ii) MOLECULE TIPO: ADN (genómico) (iii) HIPOTÉTICA: NO 35 (iv) ANTI-SENTIDO: NO (vi) FUENTE ORIGINAL: (A) ORGANISMO: Candida utilis 40 (B) CEPA: NRRL Y-1084 (ix) RASGOS: (A) NOMBRE/CLAVE: péptido maduro (B) LOCALIZACIÓN:1..2607 45 (D) OTRA INFORMACIÓN:/PRODUCTO= "Enzima invertasa (β-fructofuranosidasa)" /gen= "INV1" 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 5: ATCGGCACAG AAGCGACACT GATGTCCTCC GTCTAAAACT CATCGTTTAA TAACTTCTGC 60 ATTGGCAGCT CCGGAGCACA CTCAATTGGG ACTAAAAGAA GTAACATTTG TACTACAATG 120 55 AGTCGTATAG AGTCATGTAT AAGAAGAACA GCAAGAAAAG AAAATATTGG TGCAGAATTC

## WO 98/14600 PCT/CU97/00005

	AACAGCTTCT	GAGATCGTAA	GAACAGCCAA	TCATTTACCO	GAATTCATTA	TGATACCTAT	240
5	AGAAAGACAC	AAATTGTTGG	GTAAAACAAC	AGAACATACO	TGTATAGGGG	G TTTATACGAG	300
J	AATTTTCTTA	GACGTCTCCC	CCAGTGTCCG	CCAAAGCAAC	TTACATGTGG	G AGTTTGAATT	360
	TGGATGCGCC	TTTTCCTTTA	AACGGTCACC	TGAGGTCTGA	ATCTCAATGC	AAATATCATT	420
10	ACACCAATAA	TAAAGGTGCA	TATAACCCCA	TAACCTGTAC	: ATAAAGAACG	GCACATGATC	480
	CAATTTATCG	ACGTTATGCC	TTGTCAGACC	ATCGTCGTGA	ACTTTTCTAA	ACCGGATAAA	540
15	CTCTCGCACG	GATTATAACG	TGCGTCTGTG	ATATGCACTC	CGGAAAAAAC	CCCCGTGGAG	600
10	AAGTGAAGCG	GCCACCTGTG	GAGCNGAAAT	TTCGATCGAC	GTTTCAAGTT	CAAATGGTTT	660
	CCTGTTGTCA	AAGGGCTTGA	GATTTACCAC	TTGAGCATTT	GTGCTCAGAA	TTCGGAGAGC	720
20	ATTCCCATGA	GTGGTGTCCA	AAAACACTAT	AAAAGCAGCA	CAGGGATGTC	GTTGACAAAA	780
	GATGCCTCAG	AGGACCAAGA	AGACATCAAG	AGTCTCACGA	TGAACACTAG	TTTAGTTGAT	840
25	TCCAGCATTT	ACAGACCATT	AGTCCATCTA	ACGCCACCAG	TGGGGTGGAT	GAACGACCCT	900
25	AATGGTCTCT	TCTACGATTC	ATCTGAATCT	ACTTACCATG	TGTACTACCA	ATACAACCCA	960
•	AACGATACGA	TTTGGGGATT	GCCTCTATAT	TGGGGACATG	CCACCTCTGA	TGATTTGTTA	1020
30	ACGTGGGACC	ACCATGCGCC	TGCAATTGGA	CCTGAGAATG	ATGATGAGGG	TATTTACTCT	1080
	GGATCTATAG	TCATAGACTA	CGATAATACC	TCAGGGTTCT	TTGACGATTC	AACAAGACCA	1140
35	GAACAGAGAA	TCGTTGCCAT	TTATACCAAT	AACTTACCAG	ATGTCGAGAC	GCAAGACATT	1200
33	GCCTATTCCA	CGGACGGTGG	TTATACTTTC	GAAAAGTATG	AAAACAACCC	AGTTATAGAC	1260
	GTCAATTCGA	CCCAATTTAG	GGATCCGAAG	GTGATTTGGT	ATGAGGAAAC	TGAACAATGG	1320
40	GTCATGACTG	TGGCAAAGAG	TCAAGAGTAC	AAGATCCAGA	TTTACACCTC	TGACAATTTG	1380
	AAAGACTGGA	GTTTGGCCTC	GAATTTCTCA	ACCAAGGGTT	ATGTTGGTTA	TCAGTATGAA	1440
4 5	TGTCCAGGTC	TATTCGAAGC	CACTATTGAA	AACCCAAAGA	GTGGTGACCC	AGAGAAGAAA	1500
45	TGGGTTATGG	TCTTAGCAAT	CAATCCAGGC	TCACCTCTTG	GTGGTTCCAT	AAATGAATAC	1560
	TTTGTTGGTG	ATTTCAACGG	TACTGAATTC	ATTCCAGATG	ATGACGCTAC	AAGATTTATG	1620
50	GATACTGGTA	AGGACTTCTA	TGCCTTCCAA	GCGTTCTTCA	ATGCACCGGA	GAATCGGTCA	1680
	ATTGGAGTTG	CCTGGTCATC	GAACTGGCAG	TATTCCAACC	AGGTTCCGGA	TCCTGATGGA	1740
F. F.	TATAGAAGCT	CCATGTCATC	AATCAGAGAG	TACACTCTGA	GATATGTCAG	TACGAATCCA	1800
55	GAATCTGAAC	AGTTGATCCT	TTGTCAAAAA	CCATTCTTTG	TGAACGAGAC	AGACTTGAAG	1860

-

	GTGGTTGAAG AGTACAAGGT TTCAAACAGT TCTTTGACCG TGGACCACAC GTTTGGAAGT	1920										
	AGCTTTGCAA ACTCCAACAC CACTGGACTG TTGGATTTCA ACATGACTTT CACGGTTAAC	1980										
5	GGTACAACTG ACGTTACGCA GAAGGACTCC GTCACCTTTG AGCTCAGAAT CAAATCTAAC	2040										
	CAAAGCGACG AGGCAATTGC GCTTGGTTAC GATTACAACA ACGAGCAATT CTACATCAAC	2100										
10	AGAGCCACAG AGAGCTACTT CCAGAGAACC AACCAGTTCT TCCAGGAGAG ATGGTCCACG	2160										
10	TACGTTCAGC CTCTCACAAT CACCGAATCT GGTGATAAAC AGTACCAGCT CTACGGATTG	2220										
15	GTTGATAACA ACATCCTTGA GTTGTACTTC AACGACGGGG CATTCACATC CACAAACACC TTCTTCTTGG AGAAGGGCAA GCCATCAAAC GTCGATATCG TGGCAAGCTC CTCCAAGGAG	2280 2340										
10	GCTTACCACC GTGGACCAGC TGACTGAGAC GTCTCACTGT TTGACGAATA CGCACGTGAA	2400										
	AGCTATATAA GGGATCACGT GGTCTAGCCA CCCCAGTCTA AAAGCTTCAG CAAACCGCCA	2460										
20	CTATATAAAC AGACAGGTTT GTCACTTTTC AACAAAACAA	2520										
	TCAGAGTAGT TTGTACGAGT GCTTTTTCA ATTATATATA CAACAACGTG AGCTGCCTTT	2580										
25	GGATATGCAA TCAACAGCGC TCTCTTT	2607										
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO. 6:											
30	<ul> <li>(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:</li> <li>(A) LONGITUD: 533 aminoácidos</li> <li>(B) TIPO: aminoacidica</li> <li>(C) RAMIFICACIÓN: simple</li> <li>(D) TOPCLOGÍA: lineal</li> </ul>											
35	(ii) MOLECULE TIPO: PROTEÏNA											
33	(iii) HIPOTÉTICA: NO											
	(iv) ANTI-SENTIDO: NO											
40	(vi) FUENTE ORIGINAL: (A) ORGANISMO: Candida utilis (B) CEPA: NRRL Y-1084											
45	(ix) RASGOS:  (A) NOMBRE/CLAVE: PROTEÍNA  (B) LOCALIZACIÓN:1533											
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 6:											
50	Met Ser Leu Thr Lys Asp Ala Ser Glu Asp Gln Glu Asp Ile Lys Ser 1 5 10 15											
<b>.</b> .	Leu Thr Met Asn Thr Ser Leu Val Asp Ser Ser Ile Tyr Arg Pro Leu 20 25 30											
55	Val His Leu Thr Pro Pro Val Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu 35 40 45											

	Phe	Tyr 50	Asp	Ser	Ser	Glu	Ser 55	Thr	Tyr	His	Val	Туг 60	Tyr	Gln	Туг	Asn
5	Pro 65	Asn	Asp	Thr	Ile	Trp 70	Gly	Leu	Pro	Leu	Tyr 75	Trp	Gly	His	Ala	Thr 80
10	Ser	Asp	Asp	Leu	Leu 85	Thr	Trp	Asp	His	His 90	Ala	Pro	Ala	Ile	Gly 95	Pro
	Glu	Asn	Asp	Asp 100		Gly	Ile	Tyr	Ser 105	Cly	Ser	Ile	Val	Ile 110		Tyr
15	Asp	Asn	Thr 115	Ser	Gly	Phe	Phe	Asp 120	Asp	Ser	Thr	Arg	Pro 125		Gln	Arg
	Ile	Val 130		Ile	Tyr	Thr	Asn 135	Asn	Leu	Pro	Asp	Val 140		Thr	Gln	Asp
20	Ile 145	Ala	Tyr	Ser	Thr	Asp 150		Gly	Tyr	Thr	Phe 155	Glu	Lys	Tyr	Glu	Asn 160
	Asn	Pro	Val	Ile	Asp 165	Val	Asn	Ser	Thr	Gln 170	Phe	Arg	Asp	Pro	Lys 175	Val
25	Ile	Trp	Tyr	Glu 180	Glu	Thr	Glu	Gln	Trp 185	Val	Met	Thr	Val	Ala 190	Lys	Ser
30	Gln	Glu	Tyr 195	Lys	Ile	Gln	Ile	Tyr 200	Thr	Ser	Asp	Asn	Leu 205	Lys	Asp	Trp
	Ser	Leu 210	Ala	Ser	Asn	Phe	Ser 215	Thr	Lys	Gly	Tyr	Val 220	Gly	Tyr	Gln	Tyr
35	Glu 225	Cys	Pro	Gly	Leu	Phe 230	Glu	Ala	Thr	Ile	Glu 235	Asn	Pro	Lys	Ser	Gly 240
	Asp	Pro	Glu	Lys	Lys 245	Trp	Val	Met	Val	Leu 250	Ala	Ile	Asn	Pro	Gly 255	Ser
40	Pro	Leu	Gly	Gly 260	Ser	Ile	Asn	Glu	Туг 265	Phe	Val	Gly	Asp	Phe 270	Asn	Gly
45	Thr	Glu	Phe 275	Ile	Pro	Asp	Asp	Asp 280	Ala	Thr	Arg	Phe	Met 285	Asp	Thr	Gly
	Lys	Asp 290	Phe	Tyr	Ala	Phe	Gln 295	Ala	Phe	Phe	Asn	Ala 300	Pro	Glu	Asn	Arg
50	Ser 305	Ile	Gly	Val	Ala	Trp 310	Ser	Ser	Asn	Trp	Gln 315	Tyr	Ser	Asn	Gln	Val 320
	Pro	Asp	Pro	Asp	Gly 325	Tyr	Arg	Ser	Ser	Met 330	Ser	Ser	Ile	Arg	Glu 335	Tyr
55	Thr	Leu	Arg	Tyr 340	Val	Ser	Thr	Asn	Pro 345	Glu	Ser	Glu	Gln	Leu 350	Ile	Leu

Cys Gln Lys Pro Phe Phe Val Asn Glu Thr Asp Leu Lys Val Val Glu 360 Glu Tyr Lys Val Ser Asn Ser Ser Leu Thr Val Asp His Thr Phe Gly 5 375 Ser Ser Phe Ala Asn Ser Asn Thr Thr Gly Leu Leu Asp Phe Asn Met 10 Thr Phe Thr Val Asn Gly Thr Thr Asp Val Thr Gln Lys Asp Ser Val Thr Phe Glu Leu Arg Ile Lys Ser Asn Gln Ser Asp Glu Ala Ile Ala 425 15 Leu Gly Tyr Asp Tyr Asn Asn Glu Gln Phe Tyr Ile Asn Arg Ala Thr 440 Glu Ser Tyr Phe Gln Arg Thr Asn Gln Phe Phe Gln Glu Arg Trp Ser 20 Thr Tyr Val Gln Pro Leu Thr Ile Thr Glu Ser Gly Asp Lys Gln Tyr 470 Gln Leu Tyr Gly Leu Val Asp Asn Asn Ile Leu Glu Leu Tyr Phe Asn 25 490 Asp Gly Ala Phe Thr Ser Thr Asn Thr Phe Phe Leu Glu Lys Gly Lys 505 30 Pro Ser Asn Val Asp Ile Val Ala Ser Ser Ser Lys Glu Ala Tyr His 520 Arg Gly Pro Ala Asp 530

#### REIVINDICACIONES

- 1. Un sistema de transformación para la levadura Candida utilis caracterizado porque emplea una célula de levadura
- hospedera capaz de ser transformada con un material ADN recombinante donde dicho hospedero es defectivo en al menos una vía biosintética.
  - 2. Un sistema de transformación para la levadura *Candida* utilis según la reivindicación 1 caracterizado porque
- 10 emplea una célula de levadura hospedera que es defectiva en al menos la vía biosintética de un aminoácido.
  - 3. Un sistema de transformación para la levadura Candida utilis según las reivindicación 2 caracterizado porque emplea una célula de levadura hospedera que es defectiva en
- 15 la vía biosintética del uracilo.
  - 4. Un sistema de transformación de según la reivindicación 3 caracterizado porque dicha levadura hospedera es defectiva en la actividad de la enzima orotidin-5-fosfato descarboxilasa.
- 20 5. Un sistema de transformación según la reivindicación 4 caracterizado porque dicha célula de levadura hospedera es Candida utilis NRRL Y-1084 CUT35 (Número de Depósito Pendiente).
- 6. Un sistema de transformación para la levadura *Candida*25 *utilis* según las reivindicación 2 caracterizado porque emplea una célula de levadura hospedera que es defectiva en al menos la vía biosintética de la histidina.
  - 7. Un sistema de transformación de según la reivindicación 6 caracterizado porque dicha levadura hospedera es defectiva
- 30 en la actividad de la enzima imidazol glicerol fosfato deshidratasa.

- 8. Un sistema de transformación según la reivindicación 7 caracterizado porque dicha célula de levadura hospedera es Candida utilis NRRL Y-1084 TMN3.
- 9. Un sistema de transformación según la reivindicación 1 caracterizado porque dicho material ADN recombinante contiene un gen funcional que complementa el defecto en la vía biosintética en la cual el hospedero es defectivo.
  - 10. Un sistema de transformación según la reivindicación 9 caracterizado porque dicho gen funcional es el gen *URA3* de *Candida utilis*.

10

- 11. Un sistema de transformación según la reivindicación 10 caracterizado porque dicho material ADN recombinante son los plásmido pURA5 y el plásmido pUCURA3.
- 12. Un sistema de transformación según la reivindicación 9
  15 caracterizado porque dicho gen funcional es el gen HIS3 de Candida utilis.
  - 13. Un sistema de transformación según reivindicación 12 caracterizado porque dicho material ADN recombinante son los plásmidos pHCU37 y pHCU40.
- 20 14. Una célula hospedera de la levadura de *Candida utilis* capaz de ser transformado con un ADN recombinante donde dicho hospedero es defectivo al menos en una vía biosintética.
- 15. Una célula hospedera de levadura de la reivindicación 14
  25 caracterizada porque dicha célula hospedera es defectiva en al menos la vía biosintética de un aminoácido.
  - 16. Una célula hospedera de levadura según la reivindicación 15 caracterizada porque dicha célula hospedera es defectiva en la vía biosintética del uracilo.
- 30 17. Una célula hospedera de levadura según la reivindicación 16 caracterizada porque dicha célula hospedera es defectiva

- en la actividad de la enzima orotidin-5-fosfato descarboxilasa.
- 18. La célula hospedera de levadura según la reivindicación 17 caracterizada porque es la cepa *Candida utilis* NRRL Y-1084 CUT35 (Número de Depósito Pendiente).
- 19. Una célula hospedera de levadura según la reivindicación 15 caracterizada porque dicha célula hospedera es defectiva en la vía biosintética de la histidina.
- 20. Una célula hospedera de levadura según la reivindicación 10 19 caracterizada porque dicha célula hospedera es defectiva en la actividad de la enzima imidazol glicerol fosfato deshidratasa.
  - 21. Una célula hospedera de levadura según la reivindicación 20 caracterizada porque es la cepa *Candida utilis* NRRL Y-1084 TMN3.

15

20

- 22. Un material ADN recombinante capaz de transformar una célula hospedera de la levadura de *Candida utilis* caracterizado porque dicho material ADN recombinante contiene un gen funcional que complementa el defecto en la vía biosintética en la cual el hospedero es defectivo.
- 23. Un material ADN recombinante de acuerdo a la reivindicación 22 caracterizado porque dicho gen funcional es el gen URA3 de Candida utilis.
- 24. Un material ADN recombinante según la reivindicación 23 25 caracterizado porque dicho material ADN recombinante son plásmidos pURA5 y pUREC3.
  - 25. Un material ADN recombinante según la reivindicación 22 caracterizado porque dicho gen funcional es el gen HIS3 de Candida utilis.
- 30 26. Un material ADN recombinante según la reivindicación 25 caracterizado porque dicho material ADN recombinante son los plásmido pHCU37 y pHCU40.

- 27. Procedimiento para la transformación de la levadura Candida utilis caracterizado porque comprende:
- (a) Tratamiento de una cepa hospedera de la levadura Candida utilis con sales de metales alcalino;
- 5 (b) Contactar el producto celular del paso (a) con el material ADN recombinante bajo condiciones adecuadas para la transformación;
  - (c) Proceder bajo condiciones apropiadas para la electroporación de la cepa hospedera.
- 10 (d) Plaqueo del producto celular del paso (c) bajo condiciones selectivas del medio de cultivo.
  - 28. Procedimiento según la reivindicación 27 caracterizado porque las sales de metales alcalinos empleadas en el paso (a) son de Acetato de Litio a una concentración de 50 mM.
- 15 29. Procedimiento según la reivindicación 27 caracterizado porque dichas condiciones adecuadas para la transformación del paso (b) comprenden:
  - Igual volumen de solución de polietilenglicol (PEG) al 70% por volumen de mezcla de la suspensión celular tratada con
- 20 sales de Acetato de Litio y el ADN recombinante;
  - Incubación a 30°C durante 60 minutos;
  - Shock térmico provocado por tratamiento de la mezcla a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos; y
  - Enfriamiento en hielo durante 5 minutos.
- 25 30. Procedimiento de acuerdo a la reivindicación 27 caracterizado porque las condiciones apropiadas para la electroporación de la cepa hospedera del paso (c) son:
  - campo eléctrico de 3,5 kV/cm;
  - resistencia de 800  $\Omega$ , y
- 30 capacitancia de 25  $\mu$ F.

31. Procedimiento para la transformación de la levadura Candida utilis según la reivindicación 27 caracterizado porque emplea una célula de levadura hospedera capaz de ser transformada con un material ADN recombinante donde dicho hospedero es defectivo en al menos una vía biosintética.

5

10

25

- 32. Procedimiento según la reivindicación 31 caracterizado porque emplea una célula de levadura hospedera que es defectiva en al menos la vía biosintética de un aminoácido.
- 33. Procedimiento según la reivindicación 32 caracterizado porque emplea una célula de levadura hospedera que es defectiva en la vía biosintética del uracilo.
- 34. Procedimiento según la reivindicación 33 caracterizado porque dicha levadura hospedera es defectiva en la actividad de la enzima orotidin-5-fosfato descarboxilasa.
  - 35. Procedimiento según la reivindicación 34 caracterizado porque dicha célula de levadura hospedera es *Candida utilis* NRRL Y-1084 CUT35 (Número de Depósito Pendiente).
- 20 36. Procedimiento según la reivindicación 32 caracterizado porque emplea una célula de levadura hospedera que es defectiva en al menos la vía biosintética de la histidina.
  - 37. Procedimiento según la reivindicación 36 caracterizado porque dicha levadura hospedera es defectiva en la actividad de la enzima imidazol glicerol fosfato deshidratasa.
  - 38. Procedimiento según la reivindicación 37 caracterizado porque dicha célula de levadura hospedera es *Candida utilis* NRRL Y-1084 TMN3.
- 30 39. Procedimiento según la reivindicación 31 caracterizado porque dicho material ADN recombinante contiene un gen

funcional que complementa el defecto en la vía biosintética en la cual el hospedero es defectivo.

- 40. Procedimiento según la reivindicación 39 caracterizado porque dicho gen funcional es el gen *URA3* de *Candida utilis*.
- 41. Procedimiento según la reivindicación 40 caracterizado porque dicho material ADN recombinante son los plásmido pURA5 y el plásmido pUCURA3.
- 42. Procedimiento según la reivindicación 39 caracterizado 10 porque dicho gen funcional es el gen HIS3 de Candida utilis.
  - 43. Procedimiento según la reivindicación 42 caracterizado porque dicho material ADN recombinante son los plásmidos pHCU37 y pHCU40.
- 15 44. Una secuencia de ADN codificante para el gen URA3 de Candida utilis (No. Id. Sec. 1).
  - 45. Una secuencia de ADN codificante para el gen HIS3 de Candida utilis (No. Id. Sec. 3).
- 46. Una secuencia de ADN codificante para el gen *INV1* de 20 Candida utilis (No. Id. Sec. 5).

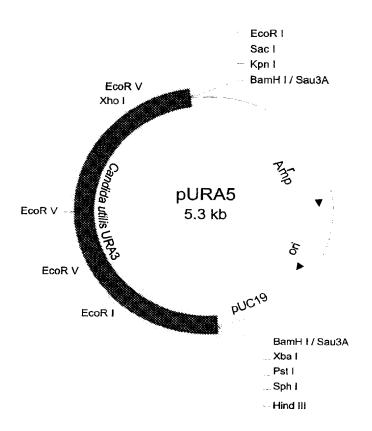


Figura 1

# 2/12

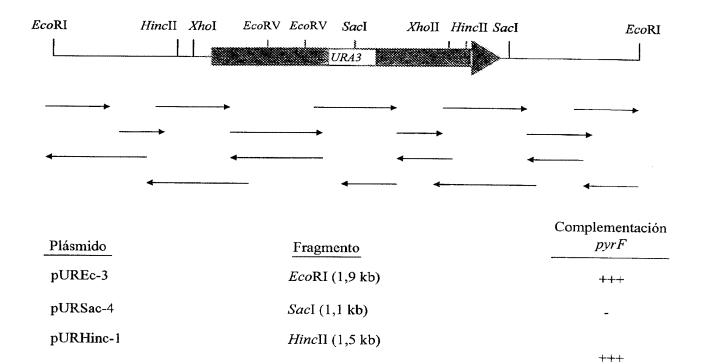


Figura 2

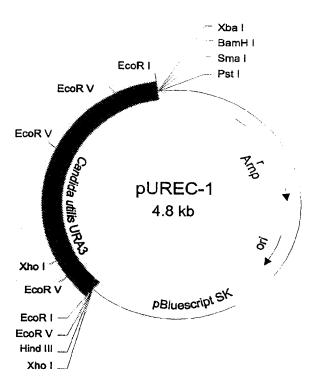


Figura 3

4/12

6 16 26 caaata getetetaet tgettetget 36 46 56 66 76 86 caacaagetg etggaactge tgetgetett ttgggtteaa ttggteeate ettgetaett tteegeetag 126 136 1.46 tttcgattcc gattctgata gagaagccca gctatgaatg gaagaaattt ttcacttttg tatgtccttt 206 176 186 196 216 226 ttttcacget tegttgette ggacaaaaaa atagtggagg cacteggtgg agggaageta teetegagat 256 266 276 286 gaaaaattto aagotoatot catogtocaa gtgggacago aagotgaggo ttotgaagag gttgaggaaa 327 336 345 354 Y Н Т L s  $\mathbf{T}$ E R Α S P S Р atg gtc acc acg tta tcg tac aca gag agg gca tcg cac cct tcg cca ctt gct aag 393 402 375 384 411 420 Т C s Μ E S ĸ K N L Α S egt etg ttt teg ett atg gag tee aag aag aeg aac etg tgt gee agt gte gat gtt 450 459 432 441 468 Е L L v D Т L egt ace aca gag gag ttg etc aag etc gtt gat acg ett ggt eet tat ate tgt etg 489 498 507 516 525 Н I D D s Μ s Α ttg aag acg cat att gat atc att gat gac ttc tct atg gag tct act gtg gct cca 546 555 564 573 582 591 E K E Н N F L I F E D A ctg ttg gag ctt tca aaa gag cac aat ttc ctc atc ttt gag gac cgt aaq ttt qct 603 612 621 630 639 G N K A 0 Y А G G К 0 gat ato ggo aac aco gto aag goa cag tao goo ggt ggt gog tto aag att goa caa 660 669 678 687 696 705 D I Т N Α Н G V т Ģ R G V 1 L tgg gca gac atc acc aac gcc cac ggt gtc acc ggt cga ggt atc gtc aag ggg ttg 717 726 735 744 753 762 D P E T Т E R G L L Α М L aag gag get gea cag gaa acc acg gat gag eea aga ggg etg ttg atg ett get gag 774 783 792 801 810 819 F Α Н G Т Y E cta age tee aag gge tee tte get cae ggg aca tat ace gag gag ace gtg gag att

4A/12

831 840 849 858 867 876 A K T D K D F C I G F I A Q R D M G G gcc aaa act gat aag gac ttt tgt att gga ttc atc gca cag aga gac atg ggt ggc 897 906 915 REDGF D W I I M aga gaa gat ggg ttc gac tgg atc atc atg aca cca ggc gtg gga ctc gac gat aag 945 954 963 972 981 G D S L G Q Q Y R T V D E V V S gge gae tee etg gge caa cag tae aga act gte gat gag gtt gte agt gge tgt 1002 1011 1020 1029 1038 D I I I V G R G L F G K G R D P T gac atc atc atc gtt ggt aga ggc ttg ttt gga aag gga aga gat cca aca gtg gaa 1059 1068 1077 1086 1095 ERYRKAG W D A Y L K R Y S A Q ggt gag cgt tat aga aaa gca ggc tgg gat gct tat ctc aag aga tac tca gct caa 1123 1133 1143 1153 1163 1173

taa acgttg agctctggct tgtataggtt cacttgtata aaatgttcat tactgttttc ggaagttgta gattgc

Figura 4

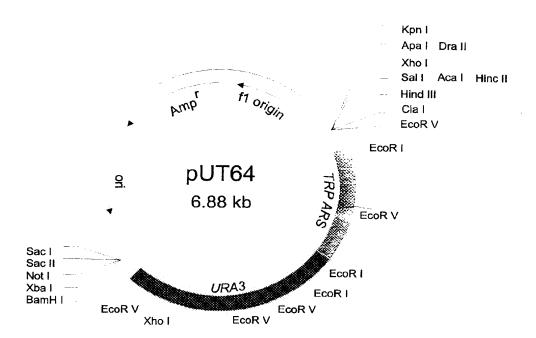


Figura 5

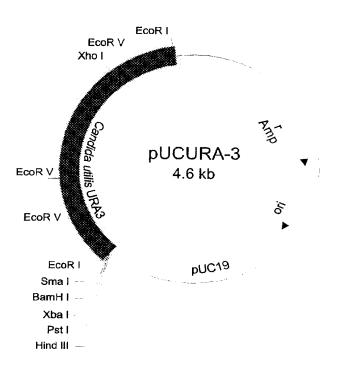
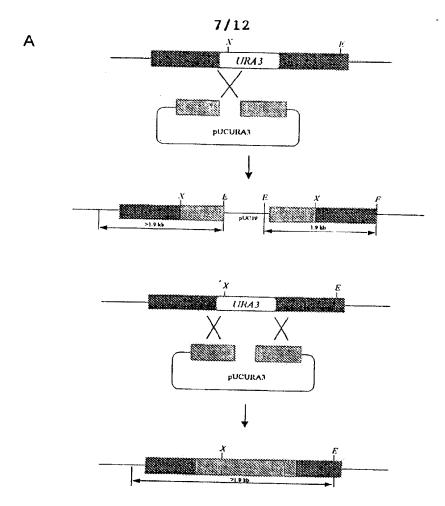


Figura 6



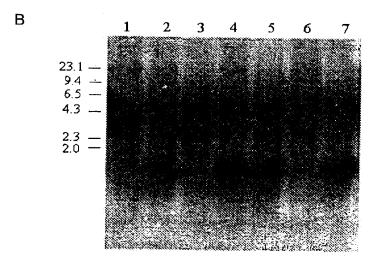


Figura 7

8/12

Figura 8

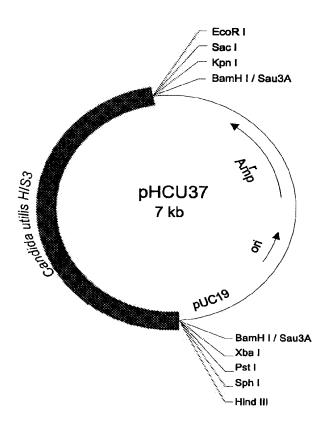


Figura 9

10/12

16 26 36 acctcc caatcgcaca ggcaacgata caaattcaac 46 56 66 86 gagtattaac catcttgtgt gctaaaaaga gtcgaagaac aacagtgcgc caaaaaaaaa actccggacc 136 146 156 166 gcacacgact catcgctctc ggaatatccc tcggaatgcg ccacttccgg gtgcgtggcc atcggaagag 186 196 206 216 226 cgaagagtca tcaccatcgt actttaacga cttactattc tcattgagta ttgagaagaa ggatagagaa 258 267 276 285 294 E R v ĸ R L N R N atg gct gaa cga acg gtg aaa ccc cag aga aga gct ctt gtg aat cgt aca aca aac 315 324 333 342 351 360 E т ĸ I I s L s L D G G Y т gaa acg aag atc cag att tcc ttg agt ttg gat ggt gga tac gta acg gtt ccg gag 372 381 390 399 408 I K ĸ ĸ Y D D Α Т Q v s tca atc ttc aag gat aag tac gac gat gct act caa gtc acc tct tct cag gtg 429 438 447 456 465 N T G v G F L D H М I H А K att tca atc aac acg ggc gtt gga ttc ctg gac cac atg atc cat gct ctt gcg aag 486 495 504 513 522 W L E С I G D L Н Ι D cat ggt ggg tgg agt ttg att gtg gag tgt att ggt gat ttg cac att gac gac cac 543 552 561 570 579 588 R G A L D Α K cac acc acc gag gac gtt ggt att gcg ctg gga gac gcc gtc aag gag gcc ttg gca 600 609 618 627 636 645 Υ v R F G s G F A ₽ E tat aga ggt gtc aag aga ttt ggt agc ggg ttt gct cca ttg gac gag gct ctg agc 657 666 675 **684** 693 702 R ν D L S N R P F v V E L K aga gcc gtt gtt gat ctg agt aac cgt ccg ttt gcc gtt gtt gag ctg gga ctc aag 714 723 732 741 750 759 K I G D L S C E M I P Н F agg gaa aag atc ggt gac ttg tca tgt gag atg att cct cac ttc ttg gag agt ttt 771 780 789 798 . 807 816 I T М H v D C L R G F gcc caa gca gct cat atc acg atg cat gtt gac tgt ttg aga ggc ttc aac gac cat 828 837 846 855 864 H R E F K L Α I к Ε I s

# 10A/12

cac	aga	gct	gaa	tcc	gca	ttc	aag	gcc	ctg	gca	gtc	gcc	att	aag	gaa	tcc	atc	tcc
			885			894			903			912			921			932
s	И	G	T	N	_		-	s	T	ĸ	G	v	L	F	*			
agt	aac	ggc	acc	aat	gat	gtt	ccc	tca	aca	aag	ggt	gtt	ttg	ttc	tag	a ta	igcad	gtett
	9	942		95	52		962			972			82		99			
tata	rtete	tc t	-att	+-														1002
3	,			-acc	y at	-aaat	aaga	act	atgt	ata	tett	tctc	ett 1	ttaat	tgta	it at	gtac	atgo
	10	12		102	22		1032	;	3	1042		10	52		106	2		1072
acag	ctga	ict c	cato	aacg	g aa	igato	ttat	tga	gtgo	age	catt	gtet	ga	state	atta	ı+ cc	.++~+	ttgc
	10	82		109	12									J	5-5-			.ccgc
							1102			.112			.22		113			1142
ggat	ttac	ca a	ıggac	tcta	c ga	ccac	tggt	ggc	tttg	gata	tgat	gtcc	tg d	cagt	actt	g ta	agac	gtgc
	11	.52		116	2		1172		1	182		11	92		120	2		J 3°
aacg	tcaa	tg g	aaac	ggca	.c cg	ttag	cctt	gat	ggtt	gca	cggg	tagg	ac t	caca	gcca	a ga	cgq	

11/12

G W M N D P N

5 GGT TGG ATG AAY GAY CCW AAY GG 3 (Oligo 5)

F R D P K V F W

3 AAR TCT CTR GGW TTC CAA AAR ACC 5 (Oligo 3 )

Figura 11

# 12/12

togg cacagaagog acactgatgt cotcogtota aaactoatog titaataact totgoattgq 55 cageteegga geacaeteaa ttgggaetaa aagaagtaae atttgtaeta caatgagteg tatagagtea tgtataagaa gaacagcaag aaaagaaaat attggtgcag aattcaacag cttctgagat cgtaagaaca gccaatcatt taccggaatt cattatgata cctatagaaa gacacaaatt gttgggtaaa acaacagaac 275 atacetgtat aggggtttat acgagaattt tettagaegt etececeagt gteegecaaa geaaettaca 345 tgtggagttt gaatttggat gegeetttte etttaaaegg teacetgagg tetgaatete aatgeaaata tcattacacc aataataaag gtgcatataa ccccataacc tgtacataaa gaacggcaca tgatccaatt 485 tategaegtt atgeettgte agaecategt egtgaaettt tetaaaeegg ataaaetete geaeggatta 555 taacgtgcgt ctgtgatatg cactccggaa aaaacccccg tggagaagtg aagcggccac ctgtggagca gaaatttega tegaegttte aagtteaaat ggttteetgt tgteaaaggg ettgagattt accaettgag 695 catttgtgct cagaattcgg agagcattcc cATG1agtggt gtccaaaaac actataaaag cagcacaggg 765 т К D Α E D 0 F D  ${
m ATG}_2$  tog ttg aca aaa gat gcc tca gag gac caa gaa gac atc aag agt ctc acg atg 800 N D S S Ι R Н agt tta gtt gat tcc agc att tac aga cca tta gtc cat cta acg cca cca aac act 879 ν D р N G L Υ D S s T Y gtg ggg tgg atg aac gac cct aat ggt ctc ttc tac gat tca tct gaa tct act tac 936 Н O Y N P N D Т I L р tac tac caa tac aac cca aac gat acg att tgg gga ttg cct cta tat tgg cat gtg S D D L L Т Н Н gga cat gcc acc tot gat gat ttg tta acg tgg gac cac cat gcg cct gca att gga 1050 р E N D E G 1 Υ S G S D D cct gag aat gat gat gag ggt att tac tct gga tot ata gto ata gao tao gat aat 1107 D s R P E 0 R acc toa ggg ttc ttt gac gat toa aca aga coa gaa cag aga ate gtt gec att tat 1164 т N N E 0 D I Α Y D acc aat aac tta cca gat gtc gag acg caa gac att gcc tat tcc acg gac ggt ggt 1221 Y Y E N N ν N tat act ttc gaa aag tat gaa aac aac cca gtt ata gac gtc aat tcg acc caa ttt 1278 R Ι Y E E T E 0 Т Α agg gat ccg aag gtg att tgg tat gag gaa act gaa caa tgg gtc atg act gtg gca 1335 K к 1 Q I Y s D N L tac aag atc cag att tac acc tot gac aat ttg aaa gac tgg agt 1392 aag agt caa gag S т Y ν G Υ Cttg gcc tcg aat ttc tca acc aag ggt tat gtt ggt tat cag tat gaa tgt cca ggt 1449 L F E E N p K S G K Κ cta ttc gaa gcc act att gaa aac cca aag agt ggt gac cca gag aag aaa tgg gtt 1506 I N P G P G G s Ε F atg gtc tta gca atc aat cca ggc tca cct ctt ggt ggt tcc ata aat gaa tac ttt 1563 G N E т Ι D D т

### 12A/12

gtt ggt gat ttc aac ggt act gaa ttc att cca gat gat gac gct aca aga ttt atq 1620 Y A F Q A F F N gat act ggt aag gac ttc tat gcc ttc caa gcg ttc ttc aat gca ccg gag aat cgg 1677 s N Y Q tea att gga gtt gee tgg tea teg aac tgg cag tat tee aac cag gtt eeg gat eet 1734 D м s I R E Y т gat gga tat aga agc tcc atg tca tca atc aga gag tac act ctg aga tat gtc agt 1791 E Q I L С Q K acg aat cca gaa tot gaa cag ttg atc ott tgt caa aaa cca tto ttt gtg aac gag 1848 Υ K ν S N S S  $\mathbf{T}$ aca gac ttg aag gtg gtt gaa gag tac aag gtt tca aac agt tct ttg acc gtg gac 1905 S F А N S N T T G L L cac acg ttt gga agt agc ttt gca aac tcc aac acc act gga ctg ttg gat ttc aac 1962 Т D Т Q ĸ D S atg act ttc acg gtt aac ggt aca act gac gtt acg cag aag gac tcc gtc acc ttt 2019 s N Q S D E Α 1 Α L G gag etc aga atc aaa tet aac caa age gae gag gea att geg ett ggt tae gat tae 2076 I N R s Y Q R aac aac gag caa tto tac atc aac aga goo aca gag ago tac tto cag aga acc aac 2133 0 s R T Y V P Q L Т I T cag tto tto cag gag aga tgg tco acg tac gtt cag cot oto aca ato aco gaa tot 2190 Y G L v  $\mathbf{D}$ N E ggt gat aaa cag tac cag ctc tac gga ttg gtt gat aac aac atc ctt gag ttg tac 2247 s Т N т F F L к G К ttc aac gac ggg gca ttc aca tcc aca aac acc ttc ttc ttg gag aag ggc aag cca 2304 D Ι v A s ĸ s S E Α Y Н R tca aac gtc gat atc gtg gca agc tcc tcc aag gag gct tac cac cgt gga cca gct 2361 D gac tga ga cgtctcactg tttgacgaat acgcacgtga aagctatata agggatcacg tggtctagcc 2429 accccagtct aaaagcttca gcaaaccgcc actatataaa cagacaggtt tgtcactttt caacaaaaca 2499 aatatettet tettttaece tteagagtag tttgtaegag tgettttte aattatatat acaacaaegt 2569 gagetgeett tggatatgea ateaacageg etetettt 2599

Figura 12

# TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTES

### FORMULARIO INTERNACIONAL

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Ave 31, entre 156 y 190, Cubanacán, Playa HABANA Cuba

nombre y dirección del depositor

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPOSITO ORIGINAL emitido según la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al pie de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO						
Referencia de la identificación dada por el DEPOSITOR: Candida utilis CUT 35	Número de Acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL CBS 100085					
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA						
El microorganismo identificado bajo I anterior fue acompañado por:  una descripción científica  una propuesta de designación taxonómica						
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN						
Esta Depositaria Internacional acepta el microorganismo depositado bajo el I anterior, el cual fue recibido por esta el <b>Miércoles</b> , <b>Octubre 1,1997</b> (fecha del depósito original) <sup>1</sup>						
IV. RECIBO DE LA PETICIÓN PARA CONVERSIÓN						
El microorganismo depositado bajo el I anterior fue recibido por esta Autoridad Depositaria Internacional el <b>no aplicable</b> (fecha del depósito original) y una petición para convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest fue recibido por esta el <b>no aplicable</b> (fecha del recibo de la petición para conversión)						
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL						
Nombre: Centraalbureau voor Schimmelcultures Dirección: Oosterstraat 1 P.O. Box 273	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional o del(los) oficial(es) autorizado(s).					
3740 AG BAAR The Netherlands	Sra.F.B.Snippe-Claus Dr.J.A.Stalpers Fecha: Viernes, 14 de Noviembre de 997					

Donde la Regla 6.4(d) se aplica, tal fecha es la fecha en la cual la categoría de autoridad depositaria internacional fue adquirida.

### TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTES

### FORMULARIO INTERNACIONAL

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Ave 31, entre 156 / 190, Cubanacán, Playa, HABANA Cuba

nombre y dirección de la parte a quien el informe de viabilidad es emitido

INFORME DE VIABILIDAD emitido según la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL de la página siguiente

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO					
Nombre: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL:					
	CBS 100085					
Dirección: Ave 31, entre 156 y 190, Cubanacán, Playa HABANA	Fecha del depósito o de la transferencia:					
Cuba	Miércoles, Octubre 1, 1997.					
III. INFORME DE VIABILIDAD						
La viabilidad del microorganismo identificado bajo II anterior fue examinada el  Lunes, Octubre 6, 1997  2En esa fecha, dicho microorganismo fue  viable  no viable						
viable 3						

Indica la fecha del depósito original o, donde un nuevo depósito o una transferencia ha sido hecha, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

 $<sup>^{2}</sup>$  En los casos referidos a la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), se refiere al examen de viabilidad más reciente.

 $<sup>^{3}</sup>$  Marcar con una cruz la casilla donde sea aplicable

# V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL Nombre: Centraalbureau voor Schimmelcultures Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional o del (los) oficial(es) autorizado(s). Sra.F.B.Snippe-Claus Dr.J.A.Stalpers The Netherlands Fecha: Viernes, 14 de Noviembre de 1997

<sup>4</sup> Llene en caso de que la información que haya sido solicitada y los resultados del examen hayan sido negativos.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No PCT/CU 97/00005

A. CLASSII IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/81 C12N9/88 C12N9/	/26	-
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both national class	ification and IPO	
B. FIELDS	SEARCHED		
Minimum do IPC 6	ocumentation searched (classification system followed by classific C12N	cation symbols)	
Documental	tion searched other than minimum documentation to the extent th	at such documents are included in the fields se	arched
Electronic d	lata base consulted during the international search (name of data	a base and, where practical, search terms used	) 
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		,
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 717 107 A (KIRIN BEER KK) 1996  see page 2, line 40 - page 3, see page 14, line 26 - line 37 see page 17, line 34 - page 18 see page 19, line 23 - page 20 see page 22, line 1 - line 20 see claims 10-13	line 40 , line 19	1-4, 9-11, 27-34, 39-41,44
		-/	
X Furt	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed	in annex.
"A" docum consi "E" earlier filing "L" docum which citatic "O" docum other	ategories of cited documents:  sent defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance document but published on or after the international date ent which may throw doubts on priority claim(s) or n is cited to eatablish the publication date of another on or other special reason (as specified) sent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means sent published prior to the international filing date but than the priority date claimed	"T" later document published after the inter- or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the invention  "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or canno- involve an inventive step when the de- "Y" document of particular relevance; the cannot be considered to involve an in- document is combined with one or m ments, such combination being obvict in the art.  "&" document member of the same patent	the application but seery underlying the claimed invention it be considered to bournent is taken alone claimed invention service step when the ore other such docupus to a person skilled
	actual completion of the international search  27 January 1998	Date of mailing of the international sec 2 0. 02, 98	arch report
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni,	Authorized officer  De Kok. A	

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatic Application No
PCT/CU 97/00005

	PC1/CU 9//00005				
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Category Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  Relevant to claim No.					
K. HAMASAWA ET AL.: "Molecular cloning and nucleotide sequence of the 3-isopropylmalate dehydrogenase gene of Candida utilis" JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 133, 1987, LONDON GB, pages 1089-1097, XP002053487 see page 1089	1,2				
PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 009, no. 012 (C-261), 18 January 1985 & JP 59 162884 A (KOJIN KK), 13 September 1984, see abstract	1				
KITADA K ET AL: "Cloning of the Candida glabrata TRP1 and HIS3 genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation" GENE, vol. 165, no. 2, 20 November 1995, AMSTERDAM NL, pages 203-206, XP004043142 see the whole document	6-8,12, 13, 19-21, 25,26, 36-38, 42,43				
OHI R ET AL: "Construction of vectors and a genomic library for use with his3-deficient strains of Schizosaccharomyces pombe" GENE, vol. 174, no. 2, 1996, AMSTERDAM NL, pages 315-318, XP004043282 see the whole document	6-8,12, 13, 19-21, 25,26, 36-38, 42,43				
EP 0 127 304 A (GENENTECH INC) 5 December 1984 see the whole document, espcially figure 13	46				
CHAVEZ F P ET AL: "Purification and characterization of an invertase from Candida utilis" ADVANCES EN BIOTECNOLOGIA MODERNA, vol. 3, 1995, XP002052628 see abstract	46				
WO 90 09449 A (HENKEL RESEARCH CORP) 23 August 1990 see page 4, line 11 - page 5, line 10	1-45				
	K. HAMASAWA ET AL.: "Molecular cloning and nucleotide sequence of the 3-isopropylmalate dehydrogenase gene of Candida utilis" JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 133, 1987, LONDON GB, pages 1089-1097, XP002053487 see page 1089  PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 009, no. 012 (C-261), 18 January 1985 & JP 59 162884 A (KOJIN KK), 13 September 1984, see abstract  KITADA K ET AL: "Cloning of the Candida glabrata TRP1 and HIS3 genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation" GENE, vol. 165, no. 2, 20 November 1995, AMSTERDAM NL, pages 203-206, XP004043142 see the whole document  OHI R ET AL: "Construction of vectors and a genomic library for use with his3-deficient strains of Schizosaccharomyces pombe" GENE, vol. 174, no. 2, 1996, AMSTERDAM NL, pages 315-318, XP004043282 see the whole document  EP 0 127 304 A (GENENTECH INC) 5 December 1984 see the whole document, espcially figure 13  CHAVEZ F P ET AL: "Purification and characterization of an invertase from Candida utilis" ADVANCES EN BIOTECNOLOGIA MODERNA, vol. 3, 1995, XP002052628 see abstract  WO 90 09449 A (HENKEL RESEARCH CORP) 23 August 1990				

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on palent family members

Internatik Application No
PCT/CU 97/00005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0717107 A	19-06-96	JP 8173170 A AU 2537795 A FI 960331 A NO 960247 A CA 2168037 A WO 9532289 A	09-07-96 18-12-95 20-03-96 22-03-96 30-11-95 30-11-95
EP 0127304 A	05-12-84	AU 2721884 A DK 204884 A JP 60041488 A	01-11-84 07-12-84 05-03-85
WO 9009449 A	23-08-90	US 5204252 A CA 2046641 A EP 0457852 A JP 4505557 T	20-04-93 09-08-90 27-11-91 01-10-92

### INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N° PCT/CU 97/00005

# A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

IPC6: C12N15/81 C12N9/88 C12N9/26

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

# B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

IPC6: C12N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

# C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoria*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes	
X	EP 0 717 107 A (KIRIN BEER KK) 19 Junio 1996 (16.06.96)  ver página 2, linea 40 - página 3, linea 40  ver página 14, linea 26 - linea 37  ver página 17, linea 34 - página 18, linea 19  ver página 19, linea 23 - página 20, linea 45  ver página 22, linea 1 - linea 20  ver reivindicaciones 10-13	1-4, 9-11, 27-34, 39-41,44	

X	documentos adicionales.		Véase el Anexo de la familia de patentes.		
*	Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de		
"A"	documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente		presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la hase de la invención		
"E"	documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma	"X"	documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique		
"L"	"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)		actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el		
"O"	documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio		documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia		
"P"	documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes		
	na en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda macional	Fecha	de expedición del informe de búsqueda internacional		
	27 enero 1998 (27.01.98)		20 Febrero 1998 (20.02.98)		
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional			onario autorizado		
Facs	ímil № S.P.T.0	Teléfo	ono N°		

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N° PCT/CU 97/00005

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
X	K. HAMASAWA ET AL.: "Molecular cloning and nucleotide sequence of the 3-isopropylmalate dehydrogenase gene of Candida utilis" JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 133, 1987, LONDON GB, páginas 1089-1097, XP002053487 ver page 1089	1,2
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 009, no. 012 (C-261), 18 enero 1985 (18.01.85) & JP 59 162884 A (KOJIN KK), 13 Septiembre 1984, (13.09.84), ver resumen	1
Y	KITADA K ET AL: "Cloning of the Candida glabrata TRP1 and HIS3 genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation" GENE, vol. 165, no. 2, 20 Noviembre 1995 (20.11.95), AMSTERDAM NL, páginas 203-206, XP004043142 ver todo el documento	6-8,12, 13, 19-21, 25,26, 36-38, 42,43
<b>Y</b>	OHI R ET AL: "Construction of vectors and a genomic library for use with his3-deficient strains of Schizosaccharomyces pombe" GENE, vol. 174, no. 2, 1996, AMSTERDAM NL, paginas 315-318, XP004043282 ver todo el documento.	6-8,12, 13, 19-21, 25,26, 36-38, 42,43
Y	EP 0 127 304 A (GENENTECH INC) 05 Diciembre 1984 (05.12.84) ver todo el documento, especialmente figura 13	46
Y	CHAVEZ F P ET AL: "Purification and characterization of an invertase from Candida utilis" ADVANCES EN BIOTECNOLOGIA MODERNA, vol. 3, 1995, XP002052628 ver resumen	46
A	WO 90 09449 A (HENKEL RESEARCH CORP) 23 Augosto 1990 (23.08.90) ver pagina 4, linea 11 - pagina 5, linea 10	1-45

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n° PCT/CU 97/00005

ocumento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación	
EP 0717107 A	19-06-96	JP 8173170 A AU 2537795 A FI 960331 A NO 960247 A CA 2168037 A WO 9532289 A	09-07-96 18-12-95 20-03-96 22-03-96 30-11-95 30-11-95	
EP 0127304 A	05-12-84	AU 2721884 A DK 204884 A JP 60041488 A	01-11-84 07-12-84 05-03-85	
WO 9009449 A	23-08-90	US 5204252 A CA 2046641 A EP 0457852 A JP 4505557 T	20-04-93 09-08-90 27-11-91 01-10-92	